

Tesis doctoral
Universidad Autónoma de Madrid

Relevancia funcional de Tpx2 en mamíferos

Cristina Aguirre Portolés

Directores: Marcos Malumbres e Ignacio Pérez de Castro

Programa de Doctorado en Biología Molecular

Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias

A mis padres y a Ana

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis empezó oficialmente en Julio de 2007 y es imposible que quede resumida en el proyecto que presentamos aquí. Ha sido un camino largo, emocionante en muchos momentos, duro en otros, con mucho trabajo y muchas experiencias inolvidables que habrían sido imposibles sin todos los que habéis estado conmigo.

En primer lugar quiero agradecerle a Marcos que me abriera las puertas del laboratorio. Gracias por tu entusiasmo y tu ayuda, porque he salido de cada reunión con más ganas de trabajar y con más ilusión que el día anterior. He aprendido muchísimo de ti. Muchísimas gracias a Iñaki por todo lo que me has enseñado. Desde cómo hacer una *miniprep* a escribir un artículo científico, por enseñarme la importancia de hacerse una buena pregunta biológica y establecer una hipótesis, lo esencial que es estudiar y leer cada día, como llevar un proyecto de investigación, etc... Gracias también porque los momentos duros me han ayudado a madurar. En resumen: gracias!

A Guillermo, gracias por el esfuerzo que haces ayudándonos a todos. Gracias por toda tu ayuda con los experimentos más “bioquímicos”. Por tu energía, tu entera disposición a ayudarme siempre, por preocuparte y preguntar “¿qué tal estás?”, por tu cariño, porque me has hecho reír muchísimo. Lo hemos pasado bien en el pasillo, eh? Es genial tenerte ahora como colega. Te vienes conmigo a Roma? :P

Gracias CDCs! Gracias porque todos y cada uno de vosotros habéis aportado algo a este trabajo y habéis hecho que mi etapa en el CDC sea inolvidable. A los que me recibieron cuando llegué: Gonzalo, porque contigo aprendí lo fundamental que es la buena organización y la constancia en nuestro trabajo. Me contagiaste tu entusiasmo en muchos momentos. A Esther, gracias por los buenos ratos que me hiciste pasar en el pasillo, todavía tengo agujetas de la risa. Muchísimas gracias a María José (Emejota), la eficiencia personificada, siempre concentrada y dando el 100% en el laboratorio. He aprendido mucho viéndote trabajar, de verdad, increíble tu energía! Gracias a Víctor, nuestros principios fueron difíciles pero era cuestión de tiempo...has sido y eres una de las personas más importantes por aquí para mí, gracias por todo Pichón. Max, *Emerito dottore*, un pilar indispensable. Gracias por tus consejos a cerca de experimentos, presentaciones, decisiones, etc. Tu visión práctica de la vida me ha ayudado en muchos momentos a tomarme las cosas de otra manera. Gracias por convertirte en mi hermano mayor. Gracias por cuidarme y por poner la banda sonora, por todo, GRACIAS! (ya te estoy oyendo decir “tampocopatanto chiquilla, tampocopatanto”). Paulina (Pauliii), tu llegada dio un giro al

CDC, muchas gracias por tus ánimos, por tu cariño y tu apoyo y por confiar en mí siempre. Bea, no cabe en esta tesis todo lo que tengo que agradecerte. En el labo has sido la mejor técnico, siempre dispuesta a ayudar con una sonrisa enorme y mucho entusiasmo. Contigo era muy fácil el trabajar. Y fuera del labo la mejor amiga que se puede tener. *Always there*. Gracias por tus ánimos, tu apoyo, tu confianza, porque me has hecho pasarlo genial y me has animado en los momentos difíciles. Gracias colega, muchísimas gracias. A María Guillaumot porque fuiste muy importante en los primeros años por aquí. Chebi, “etto eh mu sencillo” gracias por los buenos ratos que hemos pasado codo con codo en el bench. Manu, sin palabras...hemos hecho este recorrido juntos desde los cursos de doctorado y gracias a ti se ha sido más fácil de lo que parecía. Gracias por tu sentido del humor (sabes que soy tu fan número uno). Gracias por tu ayuda con *westerns*, ratones, por ser mi informático personal, etc. Estoy muy orgullosa de ti Manuel! A Marianna por tus ideas y sugerencias. Eres una “currante” y a pesar de tus agobios siempre eres capaz de avanzar, he aprendido de tí! Y Ruth, gracias por el musicote a partir de las siete de la tarde, cuando empezaba todo lo bueno en el CDC. Gracias por enseñarme tu visión filosófica y gracias por tu esfuerzo y paciencia en el laboratorio. A Marta Gómez, muchas gracias por tu labor de técnico y tu disposición, gracias especialmente por el esfuerzo que has hecho este último año. A la nueva remesa de CDCs, llenos de energía e ilusión. A Alejandra (Magna) gracias por tu contagiarme tu entusiasmo, por tu sentido del humor y paciencia. Me alucina tu capacidad de trabajo. A Carlos, el hombre tranquilo, gracias por tu ayuda con las traducciones y por tus ideas en lab meetings y reuniones, has sido un gran fichaje! A Mónica, gracias por tu entera disposición a ayudarme, por las discusiones científicas y tus consejos. Tu llegada nos ha llenado de energía. Elena Doménech (con acento en la “e”), gracias por los buenos momentos que hemos pasado en el labo, si sigues con esa dedicación vas a triunfar muchísimo así que sigue así! A Miguel (Maiki), ganando terreno poco a poco te has convertido en alguien imprescindible en el CDC, gracias por tu apoyo, sobre todo estos últimos meses. Por hacerme reír, por escucharme y por todos los cationes que me has pasado vía Spotify (...la hora cientocero...). A María Sanz, la dulzura personificada, por tu confianza en mí, por preguntarme tus dudas y hacerme sentir “útil” discutiendo los experimentos contigo y por ayudarme con las luciferasas, claro.

A los estudiantes de proyecto: Ale, Laura, Adrian, Javito y Sonia. Pero muy especialmente a los que trabajasteis con Iñaki: Fran, María, Jorge y Laura. Aprendí muchísimo enseñándoos y trabajando con vosotros. A los chicos de FP por vuestra constancia y esfuerzo. Gracias muy especialmente a Susana y Mari Luz (MariSu y MariLight) porque fuisteis mis primeras “alumnas” y me enseñasteis muchísimo; un trocito de esta tesis es vuestro, ya lo sabéis.

Gracias a Marta Cañamero por todo lo que he aprendido sentada en tu microscopio. Gracias a las chicas del animalario, muy especialmente a Sheila y a Sara porque nos hacéis la

vida muy fácil, imposible sin vosotras al cuidado de los ratones! A las Unidades del CNIO por facilitarnos las cosas y hacer que casi cualquier experimento sea posible en el Centro. Gracias a Susa por su disposición a ayudarnos siempre y a Paloma por ser el mejor relevo que podíamos tener. Dr. Paloma, muchas gracias por ayudarme con los trámites de la tesis y por hacerme reír cada vez que paso por tu mesa.

Thank you to Hyman lab in Dresden (including the Travi!). Thanks to Tony Hyman for giving me the opportunity to join the microtubules lab for a while. I'm specially grateful to Alex Bird for being such a great mentor. To all the people from "microtubules and cell division group" for your help, suggestions, ideas, etc. You gave me a new point of view in science. You taught me how to do the right question and the way to find the proper answer. Muy especialmente gracias a Elena Quesada por hacerme sentir en Dresden como en casa.

Pero no todo es ciencia y CNIO, otro trocito de este trabajo es para los que habéis llenado mi tiempo fuera del laboratorio. Gracias a Patricia, Olalla e Isabela. Por vuestra paciencia, por preguntar "qué tal tus celulillas?", por animarme en cada paso. Han pasado muchos años y ahí seguís, eso es impagable. A las biólogas: Almu, Elena, Patricia, Sonsoles, Maria Navarro, Natacha, Pablo (una más), María Moreno, Helena y Laura. Inviabile sin vosotras. Gracias por los buenísimos ratos que me habéis hecho pasar y que me han permitido desconectar. Por vuestros ánimos, las risas, por vuestro apoyo, por entender mis rachas de mucho trabajo, por todo! Especialmente a Gel (y Juan), Patricia (y Tomás), Ma y Pablo. Siempre de guardia y al acecho dispuestos a animarme: Gel haciéndome ver que se sentía orgullosa, Patricia con su sentido del humor haciéndome llorar de la risa, Pablo siendo muy pesado pero muy divertido, gracias Pablo por tu ironía, me encanta! Y María (MA.) gracias, gracias, gracias...Por la generosidad que desbordas, por no perder la paciencia y llamarme siempre, por Elkes, por editarme la tesis y por enseñarme que "más vale una colorá que ciento amarillas".

Y, sin desmerecer a todos los que he nombrado, les toca el turno a los mejores: Ana, mamá y papá. A Ana por animarme siempre y preocuparte por mí. Por hacerme reír (es que eres muy graciosa), por tu generosidad, por los ratos de sofá y compras y por venir hasta mi cuarto para acercarme el mando. Todos esos ratos me han cargado energía para seguir adelante. A mis padres, porque me habéis enseñado, entre otras muchas cosas, el valor del esfuerzo y la constancia que creo son los cimientos de esta tesis. Os he visto trabajar duro desde siempre, sin perder las fuerzas ni el ánimo y me habéis contagiado. Gracias por entender mis horarios y no protestar nunca. Gracias por vuestra generosidad, por preocuparos, por sentirnos orgullosos de cada paso pequeño que he dado, por apoyarme siempre y por hacerme la vida tan fácil. Muchas gracias a los tres por vuestro esfuerzo, tenéis que saber que no puedo estar más agradecida.

Cris.

SUMMARY

The establishment of a bipolar spindle is crucial to ensure the genome integrity in the daughter cells resulting from cell division. Tpx2 is a microtubule associated protein that activates the cell cycle kinase Aurora A and regulates the mitotic spindle. Overexpression of Tpx2 is associated with the development of different human tumors and strongly correlates with chromosomal instability. By analyzing a conditional null mutation in the mouse *Tpx2* gene, we show here that Tpx2 expression is essential for spindle function and chromosome segregation in the mouse embryo. Conditional genetic ablation of Tpx2 in primary cultures resulted in deficient microtubule nucleation from DNA and aberrant spindles during prometaphase. These cells eventually exited from mitosis without chromosome segregation. In addition, Tpx2 haploinsufficiency led to the accumulation of aneuploidies *in vivo* and increased susceptibility to spontaneous lymphomas and lung tumors. These findings indicate that Tpx2 is essential for maintaining genomic stability through its role in spindle regulation. Subtle changes in Tpx2 expression may favor tumor development. We also demonstrate that Tpx2 is essential during the adulthood in mammals. Loss of Tpx2 expression led to acute liver failure causing premature death of the mice. We also describe here a new role of Tpx2 in regulating mitogenic pathways through the control of protein trafficking from the cytoplasm to the nucleus. Together, these results reveal critical roles for Tpx2 during the cell cycle in physiological conditions and in tumors and shed light on new functions that Tpx2 exerts out of mitosis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. La división celular	6
1.1 Regulación temporal del ciclo celular	8
2. Mitosis	10
2.1 Regulación espacial de la mitosis y el gradiente de Ran-GTP	14
3. El huso mitótico: maquinaria dinámica responsable de la segregación cromosómica.....	16
3.1 Los microtúbulos: regulación y propiedades dinámicas.....	20
3.2 Los cromosomas como fuente de polimerización de microtúbulos.....	23
4. Tpx2: un regulador mitótico asociado a tumores inestables.....	24
4.1 Estructura, localización y regulación.....	24
4.2 Papel de Tpx2 en el establecimiento del huso mitótico	28
4.3 Tpx2, inestabilidad cromosómica y cáncer	30
OBJETIVOS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Ratones modificados genéticamente	37
1.1 Generación de ratones modificados genéticamente para Tpx2	37
1.2 Tratamientos y procedimientos.....	37

1.2.1 Tratamiento con 4-hidroxitramoxifeno	38
1.2.2 Ensayo de tolerancia a la glucosa	38
1.2.3 Análisis de sangre	38
1.2.4 Estudio histopatológico e inmunohistoquímico	38
1.2.5 Extracción, cultivo e inmuofluorescencia de embriones de ratón	39
2. Cultivos y ensayos celulares	40
2.1 Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón	40
2.2 Eliminación del gen <i>Tpx2</i> <i>in vitro</i>	40
2.3 Ensayos de focos	41
2.4 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	41
2.5 Análisis de polimerización de microtúbulos	41
2.6 Ensayo de estabilidad de las fibras-k	42
2.7 Inmunofluorescencia	42
2.8 Videomicroscopía	43
2.9 Extracción y cultivo de células del bazo	43
2.10 Esparcido cromosómico	44
2.11 Captación de [3H]-2-deoxy-D-glucosa	44
3. Ensayos bioquímicos	45
3.1 Inumoprecipitación e inmunodetección (<i>western blot</i>)	45
3.2 Fraccionamiento citosólico y nuclear	46
3.3 Ensayos de transcripción inversa y PCR cuantitativa	46
3.4 Ensayos de luciferasa	47
4. Estudio de tumores humanos	47
4.1 Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	47
5. Tablas de reactivos	48

RESULTADOS	50
1. Generación de un modelo de ratón deficiente en Tpx2	50
2. Tpx2 es indispensable durante el desarrollo embrionario del ratón	53
3. Regulación del ciclo celular por Tpx2	59
3.1 Alteraciones en la progresión del ciclo celular y la segregación de cromosomas en ausencia de Tpx2	59
3.2 Tpx2 es esencial para la polimerización de microtúbulos dependiente de cromatina	68
3.3 Función esencial de Tpx2 en la formación y mantenimiento de la estabilidad de microtúbulos en mitosis	73
4. Implicación de Tpx2 en la formación y el desarrollo de tumores	77
4.1 La disminución en los niveles de expresión de Tpx2 provoca inestabilidad cromosómica y aumento en la susceptibilidad al desarrollo de tumores	77
4.2 Tpx2 aparece sobreexpresado en varios tipos de cáncer humano	83
4.3 La sobreexpresión de Tpx2 induce inestabilidad cromosómica <i>in vitro</i>	86
5. Tpx2 es un gen esencial durante la vida adulta del ratón	90
5.1 La eliminación de Tpx2 en ratones adultos provoca un fallo hepático agudo incompatible con la vida	90
6. Tpx2 como regulador de la transducción de señales	100
6.1 Tpx2 está implicado en la captación de glucosa en células de ratón	102
6.2 Tpx2 es necesario para la internalización de moléculas del citoplasma al núcleo	104

DISCUSIÓN	109
1. El huso mitótico: una estructura esencial durante el desarrollo embrionario	110
2. Tpx2 como regulador del huso mitótico	113
3. Tpx2, no sólo un regulador de Aurora A	117
4. Tpx2: más allá de la regulación de mitosis	119
4.1 Tpx2, ¿nuevo regulador del transporte de moléculas del citoplasma al núcleo?	120
5. Tpx2 y cáncer	125
5.1 La inestabilidad cromosómica como motor del desarrollo tumoral en ratones <i>Tpx2</i> (+/-)	127
5.2 Papel de Tpx2 en la transducción de señales y su posible Implicación en cáncer	128
6. La importancia de controlar los niveles de expresión de Tpx2	131
CONCLUSIONES	134
REFERENCIAS	135
ANEXOS	150

ABREVIATURAS

ACA: Anticuerpo contra centrómeros (Anti-centromere antibody)

AdCre: Adenovirus que expresa la recombinasa Cre

AdGFP: Adenovirus que expresa la proteína GFP

ATP: Adenosina trifosfato (Adenosin triphosphate)

AurkA: Quinasa Aurora A (Aurora kinase A)

C.elegans: *Caenorhabditis elegans*

C3A: Caspasa 3 activa (Caspase-3active)

Cdk: Ciclina dependiente de quinasa (Cyclin dependent kinase)

cDNA: DNA codificante

CIN: Inestabilidad cromosómica (Chromosome instability)

CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

Cre: Recombinasa Cre

CREST: Calcinosis, síndrome Raynaud's, esclerodactilia y telangiectasia

CT: Cinetocoro

DAPI : 4',6-diamidino-2-fenilindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DCS: Suero de ternera (Donor calf serum)

DMEM: Medio mínimo esencial de Dulbecco (Dulbecco's modified Eagel's medium)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

DTT: Ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (Ethylenedaminetetraacetic acid)

ER: Receptor de estrógenos (Estrogen receptor)

ES: Células madre embrionarias (Embrionic stem cells)

FACS: *F*luorescence-*a*ctivated *c*ell *s*orting

FBS: Suero fetal bovino (*F*etal *b*ovine *s*erum)

FISH: Hibridación fluorescente in situ (*F*luorescence *i*n *s*itu *h*ybriditation)

Flp: Recombinasa Flp

G₀: Fase G cero del ciclo celular

G₁: Fase Gap1 del ciclo celular

G₂: Fase Gap2 del ciclo celular

GDP: Guanosina difosfato (*G*uanosin *d*iphosphate)

GFP: Proteína fluorescente verde (*G*reen *f*luorescence *p*rotein)

GTP: Guanosina trifosfato (*G*uanosin *t*riphosphate)

H&E: Hematoxilina y Eosina

HEPES: N-2-*h*idrox*e*til*p*iperazina-N'-2-*e*tanosulfónico

hGC: Gonadotropina coriónica humana (*H*uman*c*horionic*g*onadotrophin)

IF: Inmunofluorescencia

IHQ: Inmunohistoquímica

INSR: Receptor de insulina (*I*nsulin *r*eceptor)

IP: Inmunoprecipitación

IRS1: Sustrato 1 del receptor de insulina (*I*nsulin *r*eceptor *s*ubstrate-*1*)

KRH: Tampón *K*rebs *R*inger *H*epes

LAP2: *L*amina-*a*ssociated *p*olypeptide *2*

LTR: Región terminal repetida larga (*L*ong *t*erminal *r*epeat)

M: Fase M del ciclo celular

MAP: Proteína asociada a microtúbulos (*M*icrotubules *a*ssociated *p*rotein)

MEF: Fibroblasto embrionario de ratón (*M*ouse *e*mbryonic *f*ibroblast)

Min: minutos

MPC: material pericentriolar

mRFP: Proteína fluorescente roja de ratón (**M**ouse **r**ed **f**luorescence **p**rotein).

MT: Microtúbulo

NEKs: **N**ever in mitosis gene A-related **k**inases

Neo: Neomicina

Noc: Nocodazol

pA: señal de poliadenilación (**P**oly **A** tail)

PBS: Tampón de fosfato salino (**P**hosphate **b**uffered **s**aline)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (**P**olymerase **c**hain **r**eaction)

P-H3: Fosfo-histona H3 (**P**hospho-**h**istone **H3**)

PKB: Proteína quinasa B (**P**rotein **k**inase **A**)

PMSG: Gonadotropina de suero de yegua preñada (**P**regnant **m**are's **s**erum **g**onadotropin)

PP1A: Proteína fosfatasa 1A (**P**rotein **p**hosphatase **1A**)

pRb: proteína de retinoblastoma

Q-RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa inversa cuantitativa (**Q**uantitative **r**everse **t**ranscription **p**olymerase **c**hain **r**eaction)

RNA: Ácido ribonucleico (**R**ibonnucleic **a**cid)

RNAi: RNA interferente

Rpm: **R**evoluciones **p**or **m**inuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa inversa (**R**everse **t**ranscription **p**olymerase **c**hain **r**eaction)

S: Fase S del ciclo celular

SA: Aceptor de corte y empalme (**S**plicing **a**ceptor)

SAC: Punto de control mitótico (**S**pindle **a**ssembly **c**heckpoint)

SAF: Factor de ensamblaje del huso mitótico (**S**pindle **a**ssembly **f**actor)

SDS: Dodecilsulfato sódico (**S**odium **d**odecyl **s**ulfate)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Poliacrilamide gel electrophoresis)

siRNA: RNA interferente pequeño (Small interference RNA)

SKY: cariotipo espectral (Spectral karyotyping)

Sre: Serum response element

Tpr: **T**ranslocated **P**romoter **R**egion

Tpx2: Targeting Protein for Xenopus kinesin-like protein 2

X.laevis: *Xenopus laevis*

β -geo: fusión de los genes beta-galactosidasa y neomicina

4-OHT: 4-hidroxi-tamoxifeno

INTRODUCCIÓN

El término “célula” fue utilizado por primera vez en 1665, cuando Robert Hooke observó al microscopio cómo una lámina de corcho estaba constituida por cavidades poco profundas, a modo de pequeñas celditas, a las que llamó células. Pasan 147 años hasta que Robert Brown descubre el núcleo de la célula y ya hace referencia a su importancia en la fertilización. En 1839 Schleiden y Schwann enuncian su Teoría Celular según la cual “todos los organismos están compuestos de pequeñas unidades, las células”. Esta teoría postulaba que, mediante algún tipo de cristalización, las células se originaban *de novo* a partir de la materia intracelular. Este concepto equivocado frenó durante 30 años la investigación de la división celular.

Fue el patólogo alemán Rudolf Virchow quién en un trabajo publicado en 1858 enuncia su famoso aforismo “*Omnis cellula ex cellula*”, es decir, toda célula se origina a partir de otra célula ya existente. En 1882, Walther Flemming publica su libro *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (“Sustancia celular, núcleo y división celular”) en el que acuña por primera vez el término “mitosis” (del griego *mitos*, hebra) haciendo referencia a la forma que adquiriría el núcleo al entrar en división.

Llegamos a 1914, cuando Theodor Boveri enunció la importancia de la formación de estructuras bipolares para asegurar la segregación completa de una copia del material genético: “*la transmisión simétrica de los cromosomas (...) es sólo posible si las figuras mitóticas son bipolares. Si se forman tres polos o más durante mitosis, entonces la célula heredará un número anormal y extremadamente variable de cromosomas*”. Boveri también estableció por primera vez una asociación entre la alteración en el número de cromosomas y la transformación de una célula normal en célula tumoral (Boveri, 1902; Boveri 1914).

Sin la capacidad de observación y tenacidad de estos pioneros en la investigación y todos los que les siguieron, no habríamos llegado a comprender la importancia de la integridad genómica al nivel que conocemos actualmente. Ahora, es nuestro propósito continuar

desgranando los mecanismos moleculares implicados en la regulación del ciclo celular, con el objetivo último de encontrar posibles terapias que nos permitan luchar contra enfermedades del desarrollo embrionario o llegar a controlar otras patologías proliferativas como el cáncer.

1. La división celular

La consecución de cuatro procesos celulares coordinados como son el crecimiento celular, la replicación del material genético, la distribución equitativa de los cromosomas y la división en dos células hijas, constituye lo que conocemos como el ciclo celular (Norbury and Nurse 1992) (Figura 1).

En células eucarióticas la replicación de material genético sucede en una única etapa denominada “fase de síntesis” (fase S). En esta etapa, la célula duplica su DNA generando así una copia idéntica de su dotación genética. Una vez finalizada la duplicación de cromosomas y centrosomas, comienza la fase de mitosis (fase M), aquella en la que tienen lugar los cambios morfológicos más dramáticos de todo el ciclo celular y durante la cual tiene lugar la segregación de los cromosomas. Finalmente, durante la fase denominada citocinesis, la formación de un anillo contráctil en el córtex celular permite la separación de los nuevos núcleos y el citoplasma en las dos células hijas resultantes.

La progresión entre estas fases está regulada por una serie compleja de eventos que aseguran la fidelidad de la división del material genético. Estos eventos representan periodos de espera que le permiten a la célula prepararse para completar con éxito las fases S y M. Pueden englobarse en dos fases denominadas Gap1 (fase G_1) y Gap2 (fase G_2). Durante G_1 , que precede a la fase S, la célula es metabólicamente activa y crece de forma continuada, pudiendo llegar a doblar su tamaño (Pardee, 1974). Tras la fase de síntesis comienza la fase G_2 , durante la cual la célula prepara su entrada en mitosis. Estas dos fases, G_1 y G_2 , proporcionan tiempo a la célula para asegurarse de que las condiciones intracelulares y extracelulares son las adecuadas y de que tanto la replicación del DNA, como la división celular se han realizado correctamente.

De esta forma, el objetivo último de estos puntos de control será minimizar la producción y propagación de errores genéticos.

Si las condiciones no son favorables para la división, la célula entra en un estado de quiescencia conocido como G_0 (G cero). La mayor parte de las células de un organismo son células diferenciadas y altamente especializadas, que se encuentran en esta fase G_0 , fuera del ciclo celular. Sólo ante un estímulo mitogénico, algunas de estas células abandonarán su estado de reposo y entrarán en el ciclo celular.

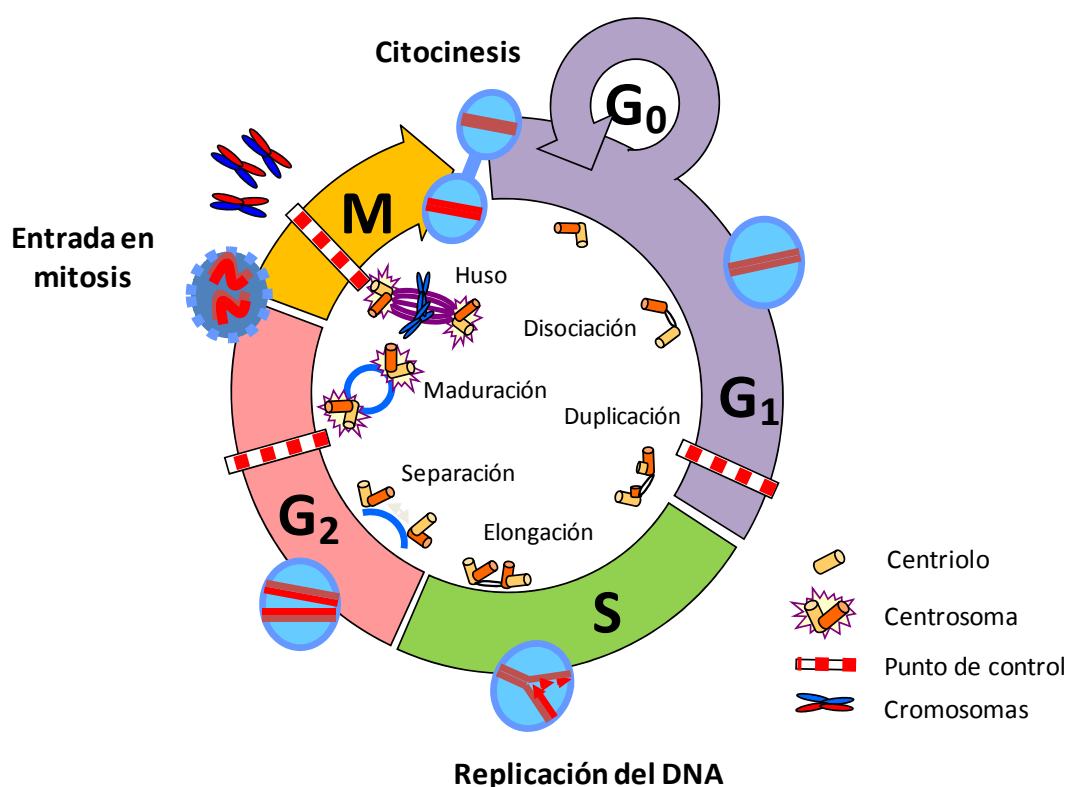


Figura 1: Regulación del ciclo celular. La fase de síntesis del DNA (S) viene precedida de G_1 , periodo en el que la célula crece y analiza si las condiciones son apropiadas para continuar el ciclo. Una vez replicado el DNA, en G_2 los centrosomas previamente duplicados comienzan a separarse y a formar el huso bipolar. Más adelante se produce la rotura de la envoltura nuclear, la formación completa del huso y, finalmente, la segregación del material genético (cariocinesis) y el citoplasma (citocinesis) en dos células hijas que deberán ser idénticas entre sí. Se muestra también el ciclo que llevan a cabo los centrosomas que, al igual que sucede con el DNA, serán duplicados y repartidos equitativamente entre las dos células hijas (modificado de De Carcer et al., 2011).

1.1 Regulación temporal del ciclo celular.

La progresión lineal y coordinada de las distintas fases del ciclo celular es un requisito imprescindible para asegurar una segregación equitativa y precisa del material genético. Para ello, la célula necesita estar sometida a mecanismos de regulación temporal que aseguren la correcta progresión de los diferentes eventos que tienen lugar. Los drásticos cambios estructurales que sufre la célula durante mitosis hacen necesaria, además, una regulación espacial muy precisa que permitirá la congregación de los cromosomas en la placa metafásica y su posterior segregación a las células hijas.

Desde un punto de vista molecular, la transición temporal a lo largo del ciclo celular está controlada por la activación, inactivación y degradación progresiva de diversas enzimas. Entre ellas, destaca la familia de las “quinasas dependientes de ciclinas” o Cdks (del inglés *Cyclin-dependent kinases*). Se trata de proteínas heterodiméricas constituidas por una subunidad proteica con actividad quinasa (serín-treonin quinasa) y una subunidad activadora llamada ciclina. Mientras que los niveles de las ciclinas oscilan a lo largo del ciclo celular, las Cdks mantienen sus niveles constantes. Así, es la expresión consecutiva de distintas ciclinas la que conlleva la activación progresiva y cíclica de las distintas Cdks. Las quinasas dependientes de ciclina también son reguladas por fosforilación o por la unión de proteínas inhibidoras, CDKI (del inglés *CDK inhibitor proteins*) y son capaces de regular la progresión el ciclo mediante la fosforilación de diversos sustratos (Malumbres and Barbacid, 2005).

El control de la transcripción proporciona una dimensión adicional a la regulación temporal del ciclo celular. Así, en células quiescentes, la proteína de retinoblastoma (pRb) bloquea la transcripción de los genes necesarios para la entrada en fase S (revisado en Harbour and Dean 2000). Bajo la estimulación por señales mitogénicas, la expresión de las ciclinas D permiten la formación de complejos heterodiméricos con Cdk4 y Cdk6 que fosforilan pRb provocando así una disminución de su afinidad por E2F. De esta forma, una vez dissociado del complejo de inhibición, E2F promueve la expresión de proteínas esenciales en la regulación del ciclo celular.

Finalmente, no podemos olvidarnos de la proteólisis cíclica como mecanismo regulador de las proteínas de ciclo. La proteólisis de ciclinas y otros reguladores está basada en un mecanismo dependiente de ubiquitinación (Pagano 1997). Esta señal post-transcripcional permite la degradación de las proteínas por el proteasoma. En las fases G₁ y S, el complejo llamado SCF (de proteína *SKP1-CUL-F-box*) participa en la ubiquitinación de las ciclinas D, E y A, y de ciertas proteínas CKI que regulan la transición G₁/S. En mitosis, el complejo promotor de anafase o ciclosoma (APC/C, del inglés *anaphase promoting complex or cyclosome*) es el encargado de ubiquitinar las ciclinas A y B, y otros reguladores mitóticos, permitiendo así la segregación de los cromosomas duplicados y la salida de mitosis (Nakayama and Nakayama 2006).

Es importante destacar que existen distintos puntos de control (*checkpoints*) a lo largo del ciclo celular. Éstos permiten que la célula se detenga hasta verificar que no existen errores incompatibles con la división equitativa del material duplicado. Los puntos de control más estudiados son el de la transición G₁/S, el inducido por daño al DNA y el punto de control mitótico o SAC (del inglés, *spindle assembly checkpoint*). En estas etapas, la célula detiene la progresión a través del ciclo celular hasta que no está preparada para duplicar su material genético (G₁/S), hasta que no ha reparado el DNA (daño al DNA) o hasta que no se ha constituido un huso mitótico bipolar con las cromátidas hermanas repartidas de forma equivalente en la placa metafásica y unidas de forma correcta a los dos polos del huso mitótico (SAC).

Todos estos mecanismos moleculares, que se activan y desactivan de forma coordinada a lo largo del ciclo celular en localizaciones subcelulares específicas, permiten que el ciclo progrese de forma coordinada y que tenga lugar una correcta segregación del material genético y, finalmente, la división celular.

2. Mitosis.

La Real Academia Española de la lengua define la mitosis como la “división de la célula en la que, previa duplicación del material genético, cada célula hija recibe una dotación completa de cromosomas”. Este término derivado del griego *mitos* (hebra), fue acuñado por Walther Flemming en 1880 haciendo referencia a la forma que adquiere el núcleo durante el proceso de división (Figura 2).

La mitosis es la fase culminante del ciclo celular en la que tanto el material genético como los centrosomas, ambos duplicados durante las fases S, son equitativamente repartidos en dos células hijas. Los errores que sucedan durante este proceso darán lugar a alteraciones genéticas que serán deletéreas para las células hijas y, más importante, para el organismo que las contiene. Por ello es necesaria una regulación espacio-temporal muy exhaustiva del proceso.

La mitosis se divide típicamente en cinco etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase (Figuras 3 y 4). Durante estas etapas, la célula debe de acometer profundos cambios morfológicos, siendo los más llamativos aquellos que afectan al DNA y a la red de microtúbulos que deberá desestabilizarse y estructurarse de nuevo para lugar al huso mitótico. La condensación de los cromosomas comienza poco después de la fase S, cuando las histonas que recubren el DNA sufren diversos cambios iniciados por su fosforilación. En el momento que la condensación cromosómica es apreciable, podemos considerar que ha comenzado la profase (Sarkar et al 2002). En esta primera etapa, existe un punto de no retorno (≈ 10 minutos antes de la rotura de la envoltura nuclear) en el que la célula pierde dependencia de su entorno y sólo la muerte podrá impedir la rotura de la envoltura y la progresión a las fases sucesivas de mitosis (Rieder C, 2011).

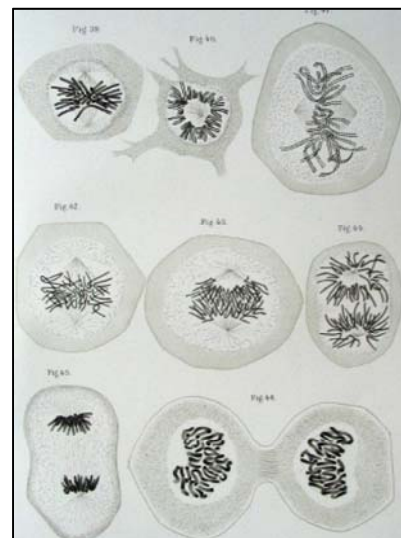


Figura 2: Mitosis. Ilustraciones realizadas por Walther Flemming (Flemming, 1882).

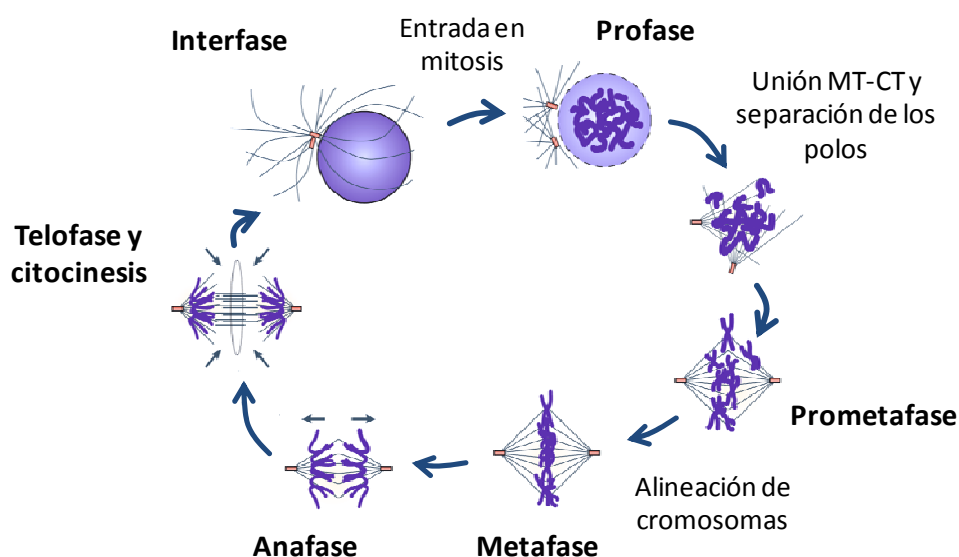


Figura 3: Cambios morfológicos durante el ciclo celular. Los cambios morfológicos que sufre la célula durante el ciclo celular se han utilizado tradicionalmente para definir las distintas fases que la constituyen. Mientras que durante interfase no hay cambios visibles al microscopio, la célula sufre diversas transformaciones durante mitosis. Durante profase, los cromosomas se condensan, se rompe la envoltura nuclear y comienza la formación del huso mitótico. En prometafase, los cromosomas son capturados por los microtúbulos y, gracias a las fuerzas de tiro y empuje, sufren oscilaciones hasta alcanzar la placa ecuatorial (metafase). En el momento en el que cada uno de los cinetocoros hermanos están unidos a microtúbulos procedentes de polos opuestos, comienza la separación de las cromátidas en la fase que denominamos anafase. Finalmente el DNA y el citoplasma son segregados en las dos células hijas durante la fase de citocinesis (adaptado de Jackson et al., 2007).

Una vez rota la envoltura nuclear, los centrosomas duplicados comienzan a polimerizar los microtúbulos que contactarán con los cromosomas y darán lugar al huso mitótico bipolar, responsable último del reparto equitativo del material genético y del citoplasma. Esta fase altamente dinámica, en la que los cromosomas sufren fuerzas de tiro y empuje, se denomina prometafase. Gracias a estas fuerzas de los microtúbulos, los cromosomas pueden llegar a congregarse, alineados, en la llamada “placa ecuatorial o metafásica”. Desde el establecimiento del huso mitótico, el SAC mantiene parada la maquinaria necesaria para la progresión mitótica hasta que todos los cromosomas están perfectamente alineados en la placa metafásica con cada uno de sus cinetocoros anclados a microtúbulos procedentes de polos opuestos. En ese

momento se considera que la célula se encuentra en metafase y está preparada para proceder a la siguiente etapa, la anafase. El inicio de ésta está marcado por la separación de las cromátidas hermanas y su desplazamiento hacia los polos opuestos del huso. Finalmente, durante la telofase, los cromosomas comienzan a descondensarse y vuelve a establecerse la envoltura nuclear, dando lugar, así, a dos núcleos idénticos. Paralelamente al inicio de anafase, comienza la división del citoplasma o citocinesis, que culmina la segregación de las dos células hijas idénticas (Robbins and Gonatas, 1964) (Figura 3).

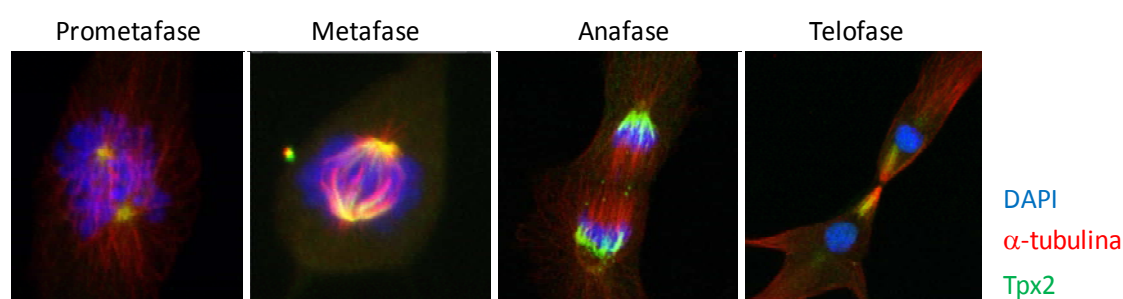


Figura 4: Segregación del material genético en dos células hijas. Una vez condensados los cromosomas, rota la envoltura y duplicados los centrosomas, arranca la maquinaria responsable de los cambios morfológicos más drásticos del ciclo celular a través de las cinco fases que constituyen la mitosis. El DNA está marcado en azul (DAPI); la α -tubulina, en rojo, decora los microtúbulos. En verde, uno de los principales reguladores del huso mitótico, Tpx2

En mamíferos, la transición entre la fase G_2 y M es inducida por la activación del complejo Ciclina B-Cdk1 (Lindqvist et al., 2009). Al final de G_2 y durante el comienzo de mitosis, Ciclina B-Cdk1 es capaz de fosforilar numerosos sustratos que serán responsables de los cambios morfológicos que tienen lugar durante las primeras etapas de la mitosis: la separación de centrosomas, la condensación del DNA (en la que también está implicada Ciclina A-Cdk2), la ruptura de la envoltura nuclear, la formación del huso mitótico, etc. No obstante, además de Cdk1, otras quinasas mitóticas contribuyen de forma decisiva a la entrada de mitosis (Nigg, 2001). De entre ellas destacan la familia de las quinasas Polo (Plk, del inglés *Polo-like kinase*) (van de Weerd and Medema, 2006), la familia de las quinasas Aurora (Carmena and Earnshaw

2003) y la familia de las NEKs (del inglés, *Never in mitosis gene A-related kinases*) (Faragher and Fry 2003). Así pues, la fosforilación llevada a cabo por esta cohorte conservada de proteínas quinasas es la responsable de la regulación de los cambios morfológicos profundos que tienen lugar durante mitosis y citocinesis. Muchas de estas quinasas comparten un mecanismo activador común que conlleva la fosforilación de un residuo de treonina dentro del conocido como *T-loop* (bucle de activación) y la unión de un coactivador (Gold et al., 2006). Estos eventos promueven la disposición de residuos claves necesarios para la transferencia del grupo fosfato del ATP unido al sitio con actividad quinasa al residuo aceptor de la proteína sustrato (Huse and Kuriyan, 2002). La fosforilación del *T-loop* puede ser autocatalítica o estar mediada por otra proteína quinasa y generalmente provoca un aumento en la actividad quinasas de varios órdenes de magnitud (Adams, 2003). El caso de la quinasas Aurora (A, B y C) ejemplifica muy bien la importancia de la activación del *T-loop*. Aurora A y Aurora B poseen dominios catalíticos altamente conservados pero presentan localizaciones muy distintas. Aurora A localiza en los centrosomas y los polos del huso y regula la duplicación y maduración de centrosomas. Aurora B localiza en los centrómeros y juega un papel esencial en el mecanismo de corrección de errores de la unión entre microtúbulos y centrómeros durante mitosis. La actividad quinasa de Aurora A está regulada por la unión directa de proteínas como Ajuba, Tpx2 o la proteína fosfatasa 1. En cambio, la actividad de Aurora B es dependiente de INCENP (del inglés, *inner centromere protein*), Survivina y Borealina (revisado en Carmena and Earnshaw, 2003). Aurora C ha sido menos estudiada que sus parálogos, presenta niveles especialmente elevados en testículo y juega un papel esencial en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Fernández-Miranda et al., 2011).

2.1 Regulación espacial de la mitosis y el gradiente de Ran-GTP

Como hemos mencionado al comienzo de la introducción, la segregación precisa de las dos copias del genoma es el punto culminante del ciclo celular. Esta distribución de la dotación genética necesita una regulación temporal muy exhaustiva y, como ya hemos visto, la fosforilación, desfosforilización y degradación de proteínas son procesos claves. Una regulación espacial de la maquinaria mitótica resulta igualmente crucial. Ya ha sido discutido por varios autores el hecho de que las estructuras mitóticas en sí mismas son capaces de organizar las propiedades dinámicas que actúan sobre ellas y cumplir, así, su función biológica última. Este es el caso de los cromosomas, que intervienen en la organización del huso mitótico para asegurar su segregación; o la zona intermedia del huso, capaz de organizar la maquinaria que permitirá su división durante telofase (Kant, 1985; Karsenti, 2008). Varias publicaciones recientes sostienen que la célula se sirve de distintos gradientes intracelulares como base de la regulación espacial de estos procesos mitóticos: gradientes de fosforilación de stathmina, gradiente de Ran-GTP y el gradiente de actividad de la quinasa Aurora B (Carazo-Salas et al., 2001; Niethammer et al., 2004; Kalab et al., 2006; Caudron et al., 2005).

En el trabajo que presentamos aquí, nos centraremos únicamente en el gradiente de Ran-GTP. Este gradiente regula varios procesos celulares entre los que se incluyen: (1) el control de la duplicación de centrosomas (Wang et al 2005); (2) la organización del áster (Gruss et al., 2004); (3) la unión de los factores asociados al huso (SAFs; del inglés *spindle assembly factors*) a la matriz del huso (Tsai et al., 2003); (4) la organización de los polos del huso (Wilde et al., 2001); (5) la dinámica de microtúbulos (Carazo-Salas et al. 2001); (6) estabilización de las fibras (Meunier and Vernos, 2012) (7) el mecanismo de “busca y captura” de cinetocoros por parte de los microtúbulos (Silverman-Gavrila 2006); (8) el ensamblaje de la envoltura nuclear en la salida de mitosis y la entrada en G₁ (revisado en Ciciarello et al. 2007); (9) el ensamblaje de microtúbulos independiente de centrosomas que tiene lugar durante apoptosis y que es responsable del fraccionamiento del núcleo (Moss et al., 2009).

El gradiente de Ran-GTP es uno de los principales reguladores de la formación de microtúbulos y del ensamblaje del huso. Ambos procesos tienen en la GTPasa pequeña Ran uno de sus principales reguladores. La evidencia más directa se la debemos al laboratorio de Mary Dasso quien, trabajando con extractos de *Xenopus laevis*, pudo demostrar que RanBP1, encargada de la conversión de Ran-GTP en Ran-GDP, reducía dramáticamente el crecimiento de microtúbulos (Kalab et al 1999). Desde entonces se han hecho muchos avances en el estudio de este mecanismo, gracias especialmente al desarrollo de biosensores que permiten visualizar el gradiente de Ran-GTP en extractos de *Xenopus* y en extractos de células humanas (Caudron et al, 2005; Kalab et al. 2006). La unión de RCC1 (del inglés, *regulator of chromosome condensation*) con la cromatina, a través de su interacción con las histonas H2a y H2b, es la fuente responsable de este gradiente de Ran-GTP que se forma durante mitosis (Nemergut et al., 2001) ya que permite el intercambio de nucleótidos de guanina necesario para la transformación de Ran-GDP en Ran-GTP. Por tanto, el ciclo entre Ran-GTP y Ran-GDP es controlado por dos reguladores específicos con localizaciones bien diferenciadas: RCC1, que es importado al núcleo e interacciona con la cromatina y Ran-GAP, activador de GTPasas, que mantiene una localización citoplasmática. Esta distribución permite que la concentración de Ran-GTP sea mayor en las proximidades de la cromatina que en la periferia y, en consecuencia, el establecimiento de un gradiente difuso de Ran-GTP durante mitosis (revisado por Ciciarello et al., 2007) (Figura 5).

Hasta el momento se han descrito varios componentes del huso mitótico regulados por este gradiente de Ran-GTP. Entre ellos, fueron NuMa y Tpx2 los primeros en ser caracterizados como tales (Gruss et al., 2001; Natchury et al., 2001).

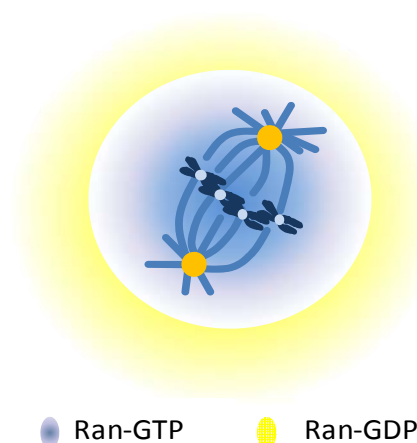


Figura 5: Gradiente de Ran-GTP. Durante mitosis, la GTPasa pequeña Ran se encuentra en altas concentraciones en las proximidades de los cromosomas mientras que su forma unida a RanGDP la más abundante en la periferia

Estas proteínas se encuentran inactivas cuando están unidas a importina α y β . La presencia de RCC1 unida a los cromosomas permite la generación de Ran-GTP que interaccionará con las importinas y permitirá la liberación de estos factores encargados del ensamblaje y estabilización del huso (Figura 6) (Clarke and Zhang, 2008; Meunier and Vernos, 2012).

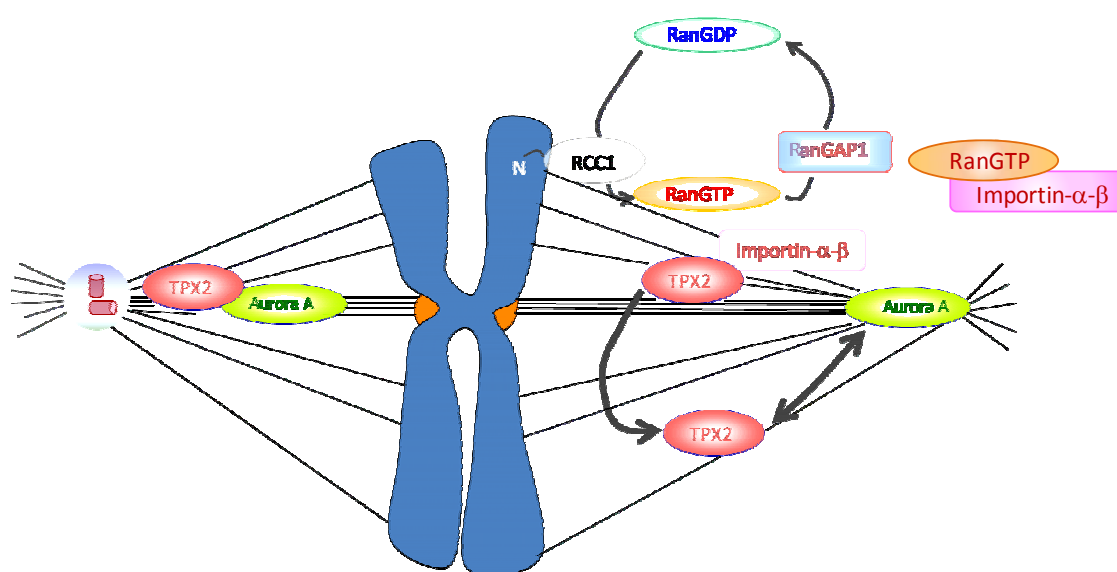


Figura 6: Regulación espacial de los factores asociados a microtúbulos. Mostramos como ejemplo el caso de TPX2, el sustrato más estudiado del gradiente de Ran-GTP. Este gradiente permite la liberación de TPX2 del complejo de inhibición que forma al estar unido con las importinas α y β . Una vez liberado, TPX2 puede ejercer sus funciones en el establecimiento del huso, entre ellas la interacción con Aurora A, protegiendo así su actividad quinasa y favoreciendo su localización en los microtúbulos. (adaptado de Clarke and Zhang, 2008)

3. El huso mitótico: maquinaria dinámica responsable de la segregación cromosómica

El huso mitótico es la maquinaria molecular capaz de distribuir el genoma equitativamente en dos células hijas y está constituido por tres componentes esenciales: centrosomas, cromosomas y microtúbulos (Figura 7). Esta estructura, que presenta disposición

bipolar, es capaz de segregar el material genético de una forma extremadamente precisa gracias a la coordinación de tres procesos biológicos esenciales: la dinámica de microtúbulos, la unión de los cromosomas a las fibras y su alineación en la placa metafásica, así como el establecimiento de los polos del huso.

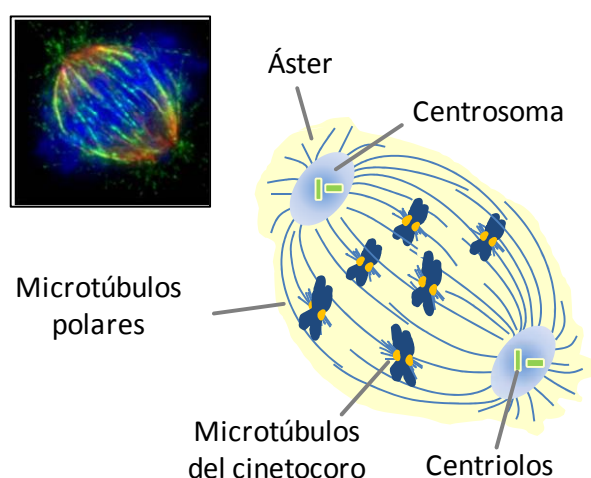


Figura 7: Huso mitótico bipolar. Esta estructura está constituida por varios tipos de microtúbulos (MT): los MT astrales, originados en los polos, crecen de forma radial hacia el exterior; los MT del cinetocoro, que conectan los polos con los cinetocoros de los cromosomas; MT polares, que se originan en los polos del huso y conectan de forma antiparalela con fibras procedentes del polo opuesto. Los centrosomas y el material pericentriolar que los rodean dan lugar a los polos del huso y son responsables de la disposición bipolar de los microtúbulos. En la fotografía superior se muestra una inmunofluorescencia de una célula en mitosis. El DNA está marcado con DAPI, en azul. En verde, la α -tubulina decora los microtúbulos. Tpx2 está marcado en rojo.

La unidad estructural principal del huso son los microtúbulos que, durante mitosis, son organizados en fibras antiparalelas y focalizadas en los centrosomas. El establecimiento de los microtúbulos en esta estructura bipolar necesita de la participación de otras moléculas que pueden tener propiedades motoras (quinasas) o “simplemente” actuar como elementos estructurales (proteínas asociadas a microtúbulos. MAPs, del inglés *microtubule associated proteins*). En ambos casos se trata de moléculas esenciales para modular la dinámica de los microtúbulos (Mao et al 2010) (Figura 8). Pero, ¿cómo se estructura este complejo macromolecular? En células animales, durante interfase, los microtúbulos se organizan a partir de un único centro organizador de microtúbulos (MTOC, del inglés *microtubule organizing center*), el centrosoma y crecen de forma radial a lo largo de todo el citoplasma. Cuando la célula entra en mitosis, la red interfásica de microtúbulos tiene que romperse para dar lugar al

huso mitótico (Figura 9). En paralelo a la replicación del DNA en fase S, tiene lugar el ciclo de duplicación del centrosoma. Durante la profase, los centrosomas duplicados viajan alrededor del núcleo mientras comienza el crecimiento de los microtúbulos astrales (Wittmann et al. 2001). Una vez rota la envoltura nuclear, estos microtúbulos astrales se acortan y los centrosomas comienzan a polimerizar microtúbulos de forma más rápida y eficiente.

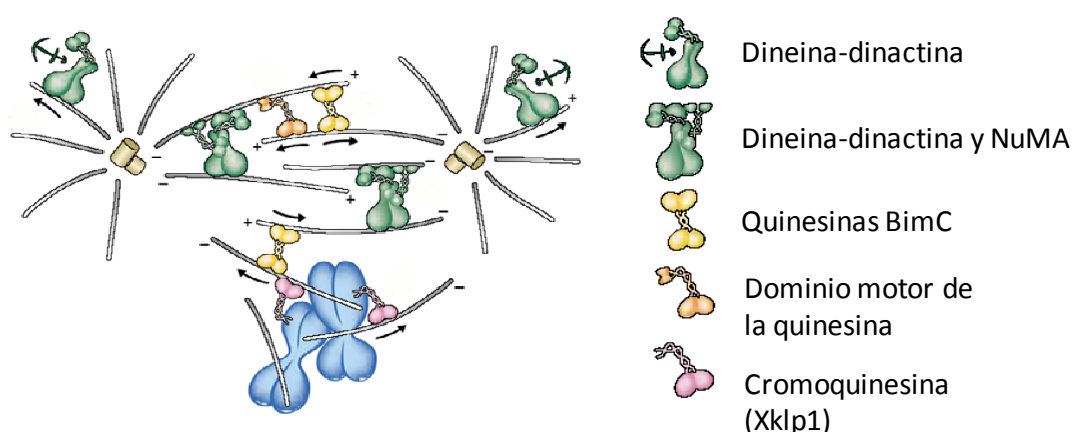


Figura 8: Mecanismo para el establecimiento y el mantenimiento de un huso bipolar. La formación del huso requiere la coordinación de la dinámica de microtúbulos, las proteínas motoras y las proteínas asociadas a microtúbulos, que darán estabilidad a las fibras. La separación de los centrosomas se mantiene gracias al equilibrio de fuerzas entre los complejos dineina-dinactina y las quinesinas, que se desplazan hacia el extremo “más, +” de los microtúbulos. Las quinesinas de la familia BimC son esenciales para la organización de microtúbulos, que crean alrededor de los cromosomas, en fibras antiparalelas. Las quinesinas de la familia del dominio motor C-terminal (Kin C) aplican una fuerza que contrarresta la separación de los polos de tal forma que controlan la velocidad del crecimiento del huso mitótico. Los complejos dineina-dinactina-NuMa, interconectan microtúbulos y gracias a su desplazamiento hacia el extremo “menos, -” del microtúbulo, participan en la focalización de los polos. Las quinesinas asociadas a los microtúbulos en el extremo “-” median la interacción entre los brazos de los cromosomas y los microtúbulos del huso y empujan los polos alejándolos de los cromosomas. Las flechas representan las fuerzas aplicadas sobre los microtúbulos por los dominios motores de varias proteínas (Wittmann et al., 2001).

Durante prometáfase, los microtúbulos, originados en los centrosomas, sufren ciclos de crecimiento y acortamiento “explorando” el entorno de forma estocástica. Mientras tanto, los cinetocoros son capaces de nuclear microtúbulos que facilitarán la conexión de los cromosomas

con microtúbulos procedentes del polo opuesto (Khodjakov et al. 2003). Algunos de los microtúbulos polares son capaces de “capturar” un cromosoma por uno de sus dos cinetocoros. Posteriormente, si el otro cinetocoro establece contacto con un microtúbulo procedente del polo opuesto tiene lugar lo conocido como “bi-orientación” del cromosoma. Esta unión “anfitética” es la única orientación que garantizará que cada cromátida hermana será incorporada a cada una de las células hijas resultantes. La unión de cinetocoros hermanos a polos opuestos y la capacidad dinámica de los microtúbulos permite el movimiento de los cromosomas a lo largo del huso. El equilibrio entre las fuerzas de tiro y empuje procedente de los microtúbulos permite la congregación de los cromosomas en la placa metafásica, una vez todos se encuentran anclados a los polos opuestos, se satisface el punto de control mitótico y comienza la transición de metafase a anafase.

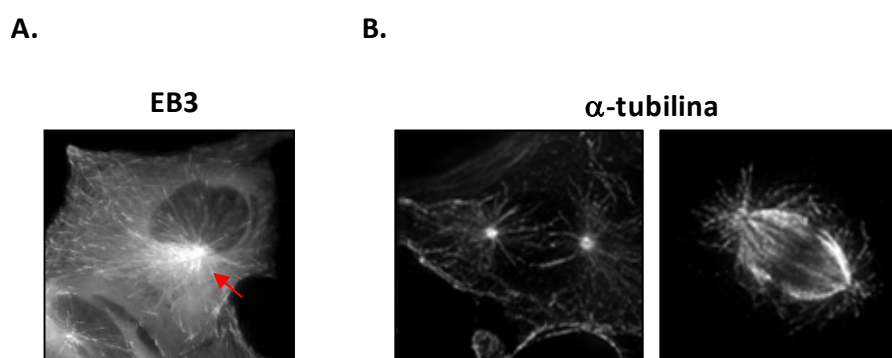


Figura 9: Reestructuración de la red de microtúbulos durante mitosis. Cuando la célula entra en mitosis, la red interfásica de microtúbulos tiene que romperse. Una vez duplicados los centrosomas, comienza su separación y la polimerización de microtúbulos que, finalmente, dará lugar a una estructura bipolar. **(A)** Célula en interfase con un único centro organizador de microtúbulos (flecha roja). El marcaje corresponde a la proteína EB-3 que decora el extremo “+” de los microtúbulos. **(B)** El panel izquierdo muestra una célula en profase donde los centrosomas ya han sido duplicados y se han separado dando lugar a los dos polos del futuro huso mitótico. El panel derecho corresponde a una célula en metafase con el huso bipolar totalmente establecido. La α -tubulina, en blanco, decora los microtúbulos.

3.1 Los microtúbulos: regulación y propiedades dinámicas

Los microtúbulos son estructuras filamentosas intracelulares responsables de múltiples procesos en la función celular. Están implicados en la organización de estructuras intracelulares, en el transporte de moléculas, en la formación y motilidad de cilios y flagelos y en la división celular (Wade et al., 2009, Carvalho-Santos et al. 2011).

La inestabilidad dinámica es la principal característica de estas fibras y es la responsable de los cambios rápidos entre fases de crecimiento y desestructuración de los microtúbulos en los procesos denominados “catástrofes” (Mitchison T and Kirschner M, 1984). Esta propiedad hace que durante mitosis la vida media de cada fibra sea del orden de segundos y su base reside en la naturaleza molecular de los microtúbulos. Están formados por dos tipos de proteínas globulares pertenecientes a la familia de las tubulinas: α - y β -tubulina. Los dímeros formados por estas moléculas dan lugar a protofilamentos. Cada microtúbulo está constituido por un total de 13 protofilamentos que, dispuestos paralelamente, dan lugar a una estructura en forma de cilindro (Figura 10). En la mayoría de las células, los microtúbulos en interfase se extienden a partir de un único centro organizador de microtúbulos, el centrosoma, que se encuentra próximo al núcleo y aparece rodeado de una estructura sin forma determinada denominada “material pericentriolar” (MPC) (Lüders and Stearns, 2007). El extremo “menos, -” de los microtúbulos se encuentra anclado a este MPC. Por tanto, es el centrosoma la estructura que establece la polaridad de los microtúbulos que crecen al añadir subunidades de tubulina en su extremo “más, +” desde el centrosoma hacia la periferia de la célula. La proteína encargada del ensamblaje de microtúbulos desde el centrosoma es la γ -tubulina (Figura 10) (Kollman et al. 2007).

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos se basa en la unión de GTP a los heterodímeros de α/β -tubulina y su posterior hidrólisis (Figura 10). Sólo aquellos dímeros de α/β -tubulina unidos a GTP pueden polimerizar, pero una vez polimerizados, el nucleótido es hidrolizado y no puede ser sustituido. La hidrólisis del GTP debilita la unión de moléculas adyacentes de tubulina y favorece, así, la despolimerización dando lugar al comportamiento

dinámico de los cromosomas (revisado en Gadde and Heald, 2004). En la base de los microtúbulos existe un sistema protector formado por subunidades unidas a GTP que mantiene la asociación entre protofilamentos vecinos. Cuando esta base protectora se pierde, los protofilamentos pierden conexión y el microtúbulo despolimeriza rápidamente (Figura 10).

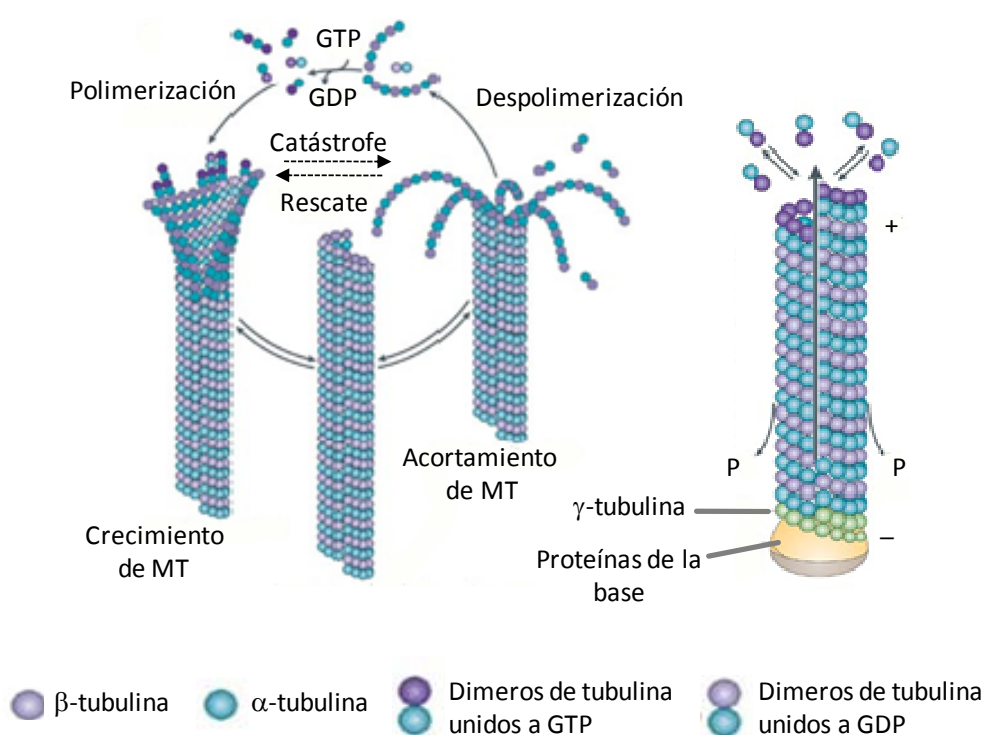


Figura 10: Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. Visión esquemática de la estructura de los microtúbulos y de su dinámica. Los microtúbulos son polímeros no covalentes del citoesqueleto que están presentes en todas las células eucariotas. Están implicados en la mitosis, desplazamiento celular, transporte intracelular de moléculas, secreción y mantenimiento de la forma y polaridad de las células. Son estructuras polarizadas formadas por heterodímeros de α/β tubulina ensamblados de forma lineal dando lugar a los protofilamentos. En mamíferos, un microtúbulo estará constituido por 13 protofilamentos que se asocian lateralmente para dar lugar a un cilindro de 25nm (adaptado de Kollman et al., 2008).

Si el filamento crece o se acorta, dependerá de la relación entre la entrada de nuevas moléculas de tubulina y la hidrólisis de GTP. Siempre y cuando la entrada de moléculas de

tubulina unidas a GTP sea más rápida que la hidrólisis del GTP, los microtúbulos podrán mantener su base protectora y continuarán con su crecimiento. Sin embargo, si la frecuencia de unión de tubulina disminuye, el GTP unido a la tubulina en el extremo “+” será hidrolizado de manera que la tubulina, unida ahora a GDP, se disociará del microtúbulo y provocará la despolimerización y el acortamiento de las fibras.

La dinámica de los microtúbulos es crucial para múltiples aspectos de la función celular y está sometida a regulación a lo largo del ciclo celular. Mientras que la vida media de estas fibras durante interfase es del orden de minutos u horas, en mitosis se ve reducida incluso a segundos. Esta capacidad dinámica de los microtúbulos se convirtió en la base de la primera hipótesis robusta de la formación del huso publicada por Kirschner y Mitchison en 1986 (Kirschner y Mitchison; 1986). A pesar de sus diversas funciones en la biología de la célula, el aspecto más crítico de la inestabilidad dinámica surge durante mitosis, cuando la célula necesita romper la red de microtúbulos de interfase y reorganizarla para dar lugar a un huso bipolar (Figura 9).

Se ha demostrado que la capacidad de crecimiento y acortamiento de los microtúbulos es mayor *in vivo* que en experimentos realizado *in vitro* con tubulina purificada (Desai and Mitchison, 1997; Cassimeris et al. 1999). Esto demuestra que los microtúbulos necesitan moléculas adicionales para controlar su inestabilidad dinámica (Figura 8). Algunas de estas proteínas tienen capacidad motora y permiten el crecimiento del huso o el mantenimiento de su tamaño; otras actúan desestabilizando las fibras. Un tercer tipo corresponde a aquellas proteínas capaces de interaccionar con los microtúbulos y proporcionar estabilidad. Todas ellas son reguladas por fosforilación y son cruciales para mantener la forma y la polaridad de las células.

3.2 Los cromosomas como fuente de polimerización de microtúbulos

Los centrosomas no constituyen la única fuente de polimerización de microtúbulos durante mitosis (Lüders and Stearns, 2007; Kalab et al. 2006). Para dar lugar al huso mitótico, las células son capaces de formar estas fibras desde los centrosomas, desde los cromosomas e incluso a partir de microtúbulos del huso previamente formados mediante el mecanismo denominado “amplificación” (Heald et al. 1996; Maiato et al. 2004)

La habilidad de los centrómeros de organizar microtúbulos fue sugerida por primera vez por Inoue y Sato (Inoue and Sato 1967) y apoyada por trabajos posteriores en los que se utilizaron cromosomas aislados y lisados celulares humanos (Telzer et al. 1975; Synder and McIntosh, 1975; Gould and Borisy, 1978; Witt et al. 1980). En 1984, Karsenti y colaboradores demostraron que al microinyectar núcleos y DNA en extractos de *X. leavis* se inducía la formación de estructuras similares a husos mitóticos (Karsenti et al. 1984). Estos descubrimientos se apoyaron más adelante en el hecho de que aquellos sistemas animales y vegetales que carecen de centrosomas son capaces de establecer husos bipolares totalmente funcionales (Heald et al, 1996; Khodjakov et al 2000). Entre los años 2001 y 2002 se describió que esta polimerización de microtúbulos dependiente de cromatina se debía a un gradiente de actividad de la GTPasa pequeña Ran que permite la activación de diversos factores que serán responsables de la polimerización de microtúbulos, su estabilidad y su dinámica (Carazo-Salas et al, 2001; Wilde et al. 2001; Kalab et al 2002).

Como hemos mencionado ya en esta introducción, la formación de microtúbulos desde los cromosomas tiene importantes consecuencias en el mecanismo de “búsqueda y captura” de los microtúbulos sobre los cinetocoros. La polimerización desde el DNA facilita el contacto de los cromosomas con los microtúbulos, dando lugar así a las fibras más estables, las fibras cinetocóricas o fibras-k (Khodjakov et al., 2003 y Maiato et al. 2004). Por tanto, los cromosomas no esperan pasivamente a ser capturados por los microtúbulos, sin embargo, forman activamente sus propias fibras promoviendo la polimerización “local” de microtúbulos que entrarán en contacto con los microtúbulos procedentes del polo opuesto del huso (Figura 11).

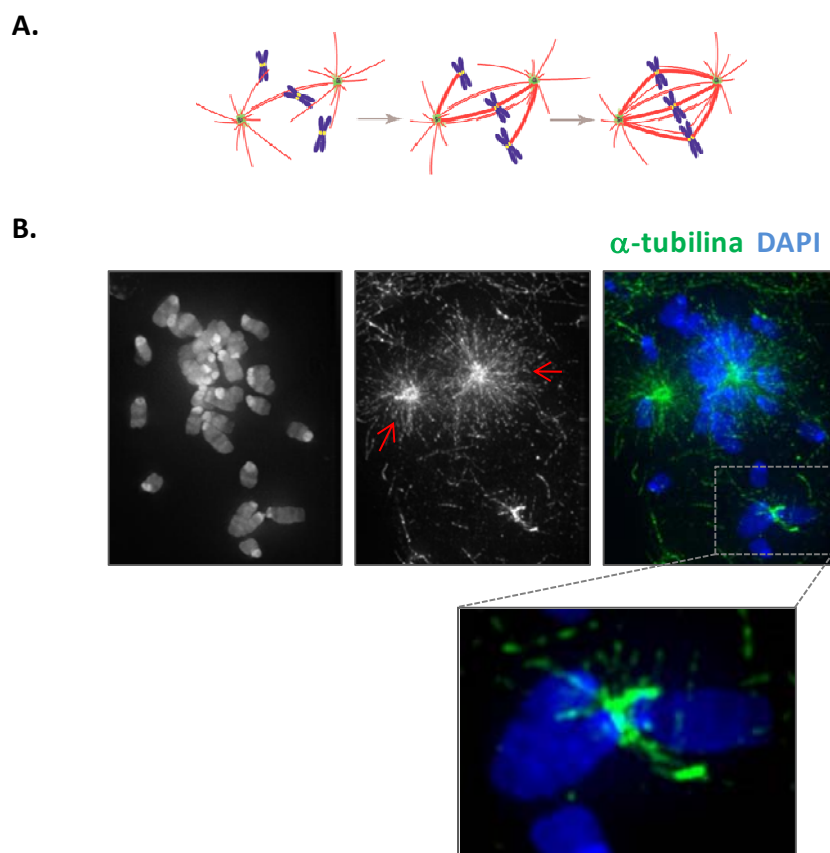


Figura 11: Polimerización de microtúbulos dependiente de cromatina. (A) Microtúbulos procedentes de los cromosomas son capturados e incluidos en la red de microtúbulos polares para formar el huso bipolar. En rojo se muestran los microtúbulos procedentes de los centrosomas; en verde las fibras procedentes de los cromosomas. **(B)** Fibroblasto embrionario de ratón tras un ensayo de despolimerización y crecimiento de microtúbulos. Se distingue la polimerización desde los dos centrosomas (flechas rojas) y la polimerización desde los cinetocoros. En azul, el DAPI marca DNA, la α -tubulina, en verde, decora los microtúbulos.

4. Tpx2: un regulador mitótico asociado a tumores inestables.

4.1 Estructura, localización y regulación

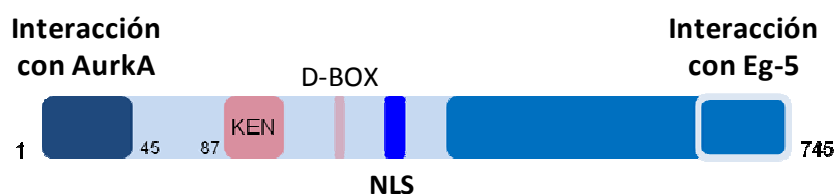
Uno de los factores regulados por el gradiente de Ran-GTP mejor estudiados es TPX2 (del inglés *targeting protein for Xklp2*). Fue descrita por primera vez en 1998 por Wittmann y colaboradores como la proteína responsable de la localización de la quinesina Xklp2 en los

extremos “-” de los microtúbulos en *Xenopus laevis* (Wittmann et al. 1998). Tpx2 no presenta homólogos en levaduras ni *Caenorhabditis elegans*, pero muy recientemente ha sido descrita una proteína que podría ser su homóloga de Tpx2 en *Drosophila melanogaster* (Goshima et al, 2012). Además, es importante destacar que en los últimos años se han publicado varios trabajos que resaltan la importancia de Tpx2 en la biología de las plantas (Evrard et al. 2009). Este ortólogo de Tpx2 posee todos los dominios funcionales presentes en mamíferos y se ha demostrado que además de las funciones mitóticas que lleva a cabo su ortólogo en ratón, desempeña funciones específicas en plantas. Tpx2 presenta localización nuclear en todas las células interfásicas, con un incremento moderado en la envoltura nuclear. En este sistema, Tpx2 juega un papel en la entrada de mitosis al regular la formación del pro-huso mitótico (*pro-spindle*) que tiene lugar antes de la rotura de la envoltura nuclear. Para ello, Tpx2 es exportado activamente del núcleo antes de la rotura de la envoltura (Vos et al., 2008; Evrard et al. 2009). O’Brien y Wiese publicaron un trabajo en 2006, en el que demuestran que esta proteína interviene en la formación de la envoltura nuclear después de mitosis a través de su interacción con la proteína LAP2 (del inglés, *lamina-associated polypeptide 2*) (O’Brien and Wiese, 2008).

En células de mamífero, Tpx2 presenta localización nuclear durante interfase, pasa a los centrosomas en G₂ y decora los microtúbulos desde profase hasta telofase. Finalmente, durante citocinesis Tpx2 localiza en el anillo contráctil (Figura 12). Es importante resaltar que Tpx2 aparece localizado en el núcleo momentos antes de la rotura de la envoltura nuclear. Una vez que esta envoltura se ha roto, Tpx2 decora los centrosomas y los microtúbulos que comienza a polimerizar en las proximidades de los cromosomas (Figura 13).

Son varios los mecanismos encargados de regular Tpx2 durante la progresión del ciclo celular. Su regulación temporal es llevada a cabo por el complejo APC/C-Cdh1 que degrada Tpx2 durante citocinesis (Stewart and Fang, 2005).

A.



B.

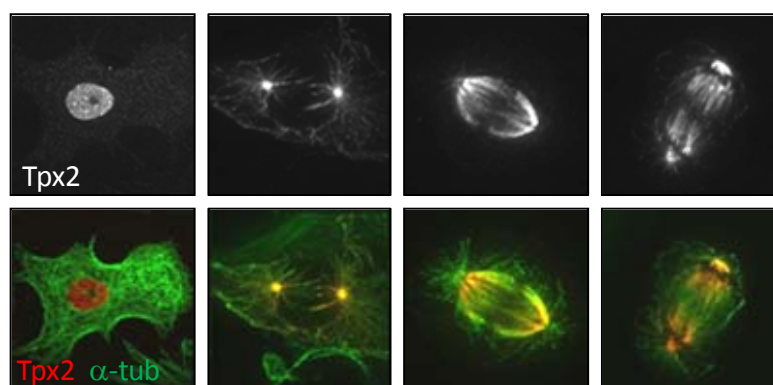


Figura 12: Estructura y localización de Tpx2. (A) Esquema representativo de la estructura de Tpx2. La región N-terminal es responsable de la interacción, activación y localización de la quinasa Aurora A. La parte C-terminal es responsable de la interacción con microtúbulos y las quinesinas Eg-5 y Kif15. Tpx2 presenta una señal de localización nuclear. Las regiones D-box y KEN le hacen susceptible a la degradación por el complejo APC/C-Cdh1. (B) Localización de Tpx2. Tpx2 localiza en el núcleo durante interfase. Al comienzo de mitosis decora los centrosomas. En etapas más avanzadas de la mitosis, Tpx2 localiza en los microtúbulos. Finalmente en la salida de mitosis es degradado por APC/C-Cdh1.

Tpx2 también se ve sometida un control muy preciso de su localización. En este caso la regulación es llevada a cabo por la GTPasa pequeña nuclear Ran, responsable de su actividad en la proximidad de los cromosomas (Clarke and Zhang, 2008) (Figura 6). Durante interfase, TPX2 permanece en el núcleo inhibido mediante la formación de un complejo con importina- α - β . La unión de Ran-GTP a la importina, permite la liberación de TPX2 del complejo de inhibición, de forma que es capaz de unirse a la quinasa Aurora A (Figura 14) (Gruss et al., 2001). Durante metafase y anafase, Tpx2 es desplazado hacia los polos desde la zona media del huso, a una velocidad mayor que el propio flujo de los microtúbulos. Este desplazamiento es dependiente

de la quinesina Eg-5, la dineína y el flujo de los microtúbulos y tiene lugar, especialmente, en las proximidades de la placa ecuatorial del huso. Sin embargo, en los microtúbulos interzonales así como en los polos, Tpx2 permanece más estático (Ma et al., 2011). Gracias a este flujo de Tpx2 hacia los polos, la célula es capaz de regular el balance entre la polimerización de microtúbulos desde la cromatina y desde los centrosomas. El dominio C-terminal de esta proteína es el responsable del avance de Tpx2 hacia los polos. La expresión de una forma mutada carente de este dominio provoca defectos en la formación de las fibras-k, la unión de los cromosomas, la formación del huso y, en definitiva, la progresión de mitosis (Brunet et al., 2004).

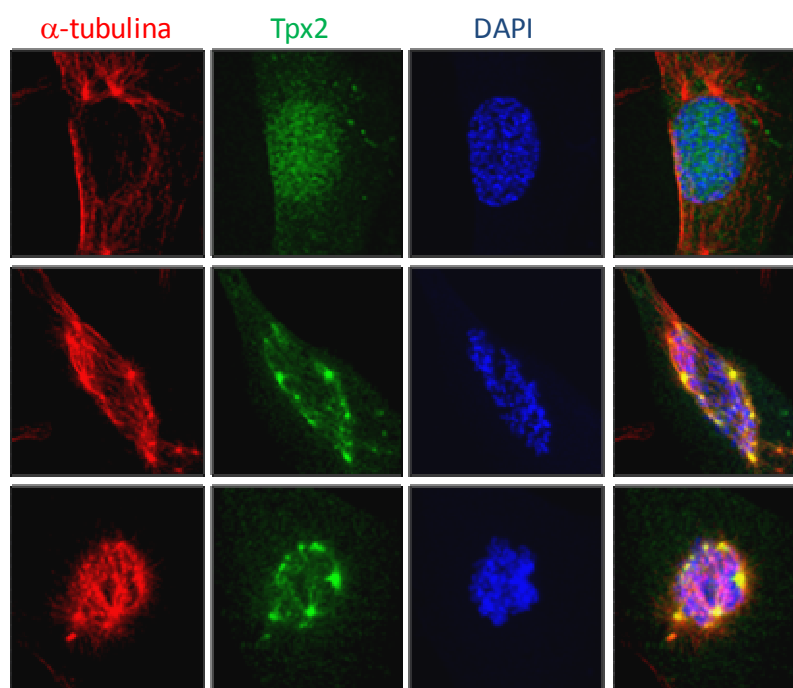


Figura 13: Localización de Tpx2 al comienzo de mitosis. Tpx2 presenta localización nuclear antes de la rotura de la envoltura nuclear. Una vez rota la envoltura, Tpx2 decora los centrosomas y los microtúbulos que comienzan a polimerizar en las proximidades de los cromosomas dando lugar, así, a varios centros organizadores de microtúbulos.

4.2 Papel de Tpx2 en el establecimiento del huso mitótico

Tpx2 es capaz de regular la formación del huso a distintos niveles. Una vez liberado del complejo inhibitorio que forma con las importinas α y β , es capaz de promover la polimerización de microtúbulos desde la cromatina, tanto en extractos de *X. laevis* (Brunet et al., 2004) como en células humanas (Hyman and Bird 2008).

La principal función de Tpx2 descrita hasta ahora es la de regular la actividad de una de las proteínas cruciales para la progresión de mitosis, la quinasa Aurora A (Eyers et al. 2004). Esta regulación ocurre a varios niveles, TPX2 es responsable de la localización de la quinasa en los microtúbulos del huso y su interacción directa incrementa la actividad de Aurora A mediante la protección de desfosforilación por la Proteína Fosfatasa 1 (PP1, del inglés *protein phosphatase 1*) (Kufer et al., 2002; Eyers et al., 2003). En concreto, el dominio N-terminal de TPX2 interacciona con el C-terminal de la quinasa protegiendo, así, de la desfosforilación a la Thr288 (*T-loop*), responsable de su actividad quinasa. De esta manera, la interacción entre ambas proteínas hace inaccesible este *T-loop* para PP1, (Eyers 2003; Bayliss et al. 2003) (Figura 14). Las células deficientes en el complejo Aurora/Tpx2 presentan husos mitóticos cortos y, aunque son capaces de segregar los cromosomas en dos células hijas, esta división no es equitativa (Bird and Hyman, 2008). Por otra parte, el grupo de Giulia Guarguaglini ha demostrado que Tpx2 regula la estabilidad de Aurora A en las fases iniciales de mitosis, protegiéndola de la degradación por el complejo APC/C-Cdh1. La disminución en los niveles de Tpx2 por RNA interferente en células humanas provoca una disminución temprana (prometáfase) en los niveles de la quinasa (Giubettini et al., 2010). En este mismo trabajo, los autores demuestran que el papel estabilizador de Tpx2 sobre Aurora A comienza en G₂, cuando ambas proteínas localizan en el núcleo.

El mantenimiento de los niveles de expresión de Tpx2 es crucial para el equilibrio entre las fuerzas motoras durante el establecimiento del huso mitótico. Así, Tpx2 es capaz de regular la actividad de la quinesina Eg-5 y su localización en los microtúbulos (Ma et al. 2011). Esta quinesina forma tetrámeros e interacciona con los microtúbulos antiparalelos permitiendo,

gracias a su actividad motora, la separación de los polos del huso. Hklp2/Kif15 es otra quinesina cuya localización y actividad es regulada por Tpx2 (Wittmann et al. 1998; Tanenbaum et al. 2009; Vanneste et al. 2009). Mientras que la separación inicial de los polos del huso depende de la actividad de Eg-5, Kif15 es responsable del mantenimiento de la bipolaridad en las fases sucesivas. De hecho, una vez se establece el huso bipolar gracias a Eg5, Kif15 es suficiente para mantener la estructura bipolar (Tanenbaum et al. 2009; Vanneste et al. 2009). Además de regular a la quinasas Aurora A, Kif15 y Eg5, Tpx2 es también necesario para la localización de SAF-A (del inglés, *scaffold attachment factor A*), proteína nuclear en interfase que contribuye a la localización de la quinasas Aurora A en los microtúbulos durante mitosis (Ma et al. 2011b; Roming et al., 1992).

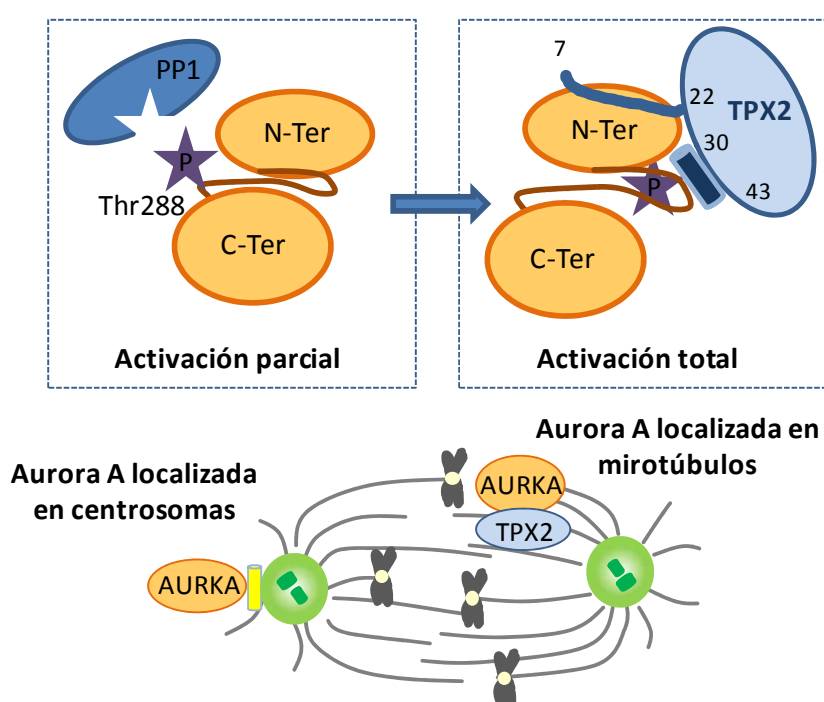


Figura 14: TPX2 regula la activación y localización de la quinasas Aurora A. El dominio catalítico de Aurora A se activa por autofosforilación en la treonina 288. La fosfatasa PP1 es la responsable de la defosforilación e inactivación de la quinasas. Cuando TPX2 interacciona con Aurora A, un cambio en su conformación deja protegida la Thr288 frente a la acción de PP1 de forma que la quinasas queda totalmente activada. Tpx2 es responsable de la localización de Aurora A en los microtúbulos del huso (Adaptado de Asteriti et al., 2010).

Tpx2 es capaz de interactuar con estas proteínas de forma directa, de manera que el modelo propuesto por varios autores sostiene que Tpx2 localiza en los microtúbulos durante el ensamblaje del huso mitótico y una vez ahí, comienza a reclutar las distintas quinesinas o reguladores del huso necesarias para la dinámica y mantenimiento de su estabilidad (Ma et al., 2010; Tulu et al., 2006).

Podemos concluir que la regulación de Tpx2 en tiempo y en espacio es esencial para la correcta progresión del ciclo celular. Se ha demostrado, en células HeLa, que la eliminación de TPX2 por RNA interferente causa problemas en la correcta alineación de los cromosomas en la placa metafásica, da lugar a husos mitóticos con más de dos polos y provoca una parada de las células en prometáfase (Garret et al. 2002). Estas mismas alteraciones se han visto en extractos mitóticos de *X. laevis*, donde se ha interferido Tpx2 mediante el uso de anticuerpos (Wittmann et al., 2000).

4.3 Tpx2, inestabilidad cromosómica y cáncer

Para el desarrollo tumoral, es necesario que las células adquieran alteraciones genéticas sucesivas que terminarán provocando su transformación en células malignas. Tanto el análisis de tumores humanos como los trabajos de investigación realizados con modelos animales, han permitido resaltar la analogía existente entre el desarrollo tumoral y la teoría evolutiva de Darwin. En ambos casos, se produce una serie progresiva de alteraciones genéticas que suponen una ventaja de crecimiento y que, en el caso de los tumores, provoca la transformación de una célula normal en una célula tumoral. Pero no se trata de la “simple” adquisición de mayores capacidades proliferativas. Las células tumorales adquieren también la capacidad de eludir la señales que dictan la muerte celular, adquieren un potencial ilimitado para duplicar el material genético, desarrollan capacidades angiogénicas y, por último, ponen en marcha mecanismos que les permiten invadir tejidos adyacentes (Lou et al. 2009). Estas seis alteraciones constituyen la esencia de la transformación celular maligna (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

Durante las dos últimas décadas un importante número de estudios han documentado las consecuencias que las alteraciones en la regulación del ciclo celular tienen en el desarrollo de tumores humanos (Malumbres and Barbacid 2001). Aunque la mayor parte de las alteraciones encontradas en tumores se asocian a la transición G₁/S, al menos 50 genes mitóticos muestran alteraciones en su expresión en distintos tipos de cánceres (Pérez de Castro et al., 2007). Éstas alteraciones pueden ser genéticas o epigenéticas, y en un porcentaje elevado de casos, están asociadas con un fenotipo de inestabilidad cromosómica (Kops et al., 2005).

Hace más de un siglo, el naturalista Theodor Boveri predijo la asociación entre las alteraciones cromosómicas y el desarrollo y la progresión del cáncer (Boveri, 1914). Tal y como se predijo, estudios posteriores han demostrado que las alteraciones en reguladores mitóticos inducen inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *chromosome instability*), característica relacionada, de una forma u otra, con procesos cancerígenos. Los mecanismos que provocan CIN incluyen defectos en la dinámica y unión entre cinetocoros y microtúbulos, el número de centrosomas y el punto de control mitótico (Gordon et al. 2012) (Figura 15)

Es importante establecer la diferencia entre las aneuploidías y la inestabilidad cromosómica. La aneuploidía se define como la presencia de un número anormal de cromosomas sobre la dotación diploide normal. Sin embargo, CIN hace referencia a la persistencia de una tasa variable de pérdidas o ganancias de cromosomas. Ambas son características comunes en el desarrollo de tumores (Schvartzman et al., 2010). Si bien la inestabilidad cromosómica da lugar a aneuploidías, no todas las células aneuploides presentan CIN; algunas células son aneuploides pero presentan un cariotipo que se mantiene estable con el tiempo.

CIN es una de las características más consistentes en tumores sólidos. Gracias al trabajo con modelos animales, se ha podido demostrar que la CIN no es sólo un fenotipo presente en los tumores, si no que, probablemente, tiene una relación causal con la adquisición de las propiedades malignas de las células tumorales (revisado por Schvartzman et al. 2010). De hecho, la detección de CIN en estadios muy tempranos del desarrollo de determinados cánceres sugiere que estas alteraciones pueden actuar como motores de tumorigénesis (Shih et al., 2001).

Cabe destacar que las alteraciones de los reguladores mitóticos son más frecuentes en cánceres positivos para CIN. Existen varias evidencias que relacionan Tpx2 con la progresión tumoral y la transformación maligna de las células (Tabla 1). Así, Tpx2 aparece amplificado en cáncer de pulmón (Tonon et al., 2005) y en tumores de células gigantes de hueso (Smith et al., 2006). Del mismo modo, su expresión aparece alterada en carcinomas endometriales (Bonatz et al., 2001), neuroblastoma (Krams et al. 2003), cáncer de mama (Mohsenifar et al., 2007) y carcinoma de las glándulas salivares (Shigeishi et. al 2009). Además, ha sido relacionado con la transformación maligna del epitelio respiratorio (Ma et al. 2006) y la progresión del cáncer de células escamosas de pulmón (Lin et al., 2006). En 2006, el grupo del doctor Szallasi, desarrolló un método computacional para establecer una correlación entre la presencia de CIN en tumores humanos y los niveles de expresión de determinados genes. Con este nuevo parámetro, los autores resumen el total de aberraciones cromosómicas presentes en un tumor en una única variante que denominan tFA (del inglés, *total functional aneuploidy*). De los 10.151 genes analizados, 70 presentaron una correlación significativamente mayor con el tFA. TPX2 fue el gen que presentó la correlación más elevada entre su nivel de sobreexpresión, la presencia de alteraciones cromosómicas y un pronóstico más grave de la enfermedad (Carter et al., 2006). Por lo tanto, la amplificación y sobreexpresión de TPX2 no sólo está asociada con el desarrollo de diferentes tumores humanos, sino también lo está con sus propiedades genéticas y con su agresividad.

Como hemos mencionado antes, Tpx2 es el principal regulador de la quinasa Aurora A, proteína oncogénica, actualmente diana potencial de terapias antitumorales. A este respecto, cabe destacar la revisión publicada por Anna Asteriti y colaboradores en 2010. En este trabajo, los autores presentan el complejo Aurora-A/Tpx2 como un holoenzima oncogénica con consecuencias específicas en la transformación celular y la tumorigénesis cuando ambos miembros del complejo aparecen sobreexpresados simultáneamente (Figura 16) (Asteriti et al. 2010).

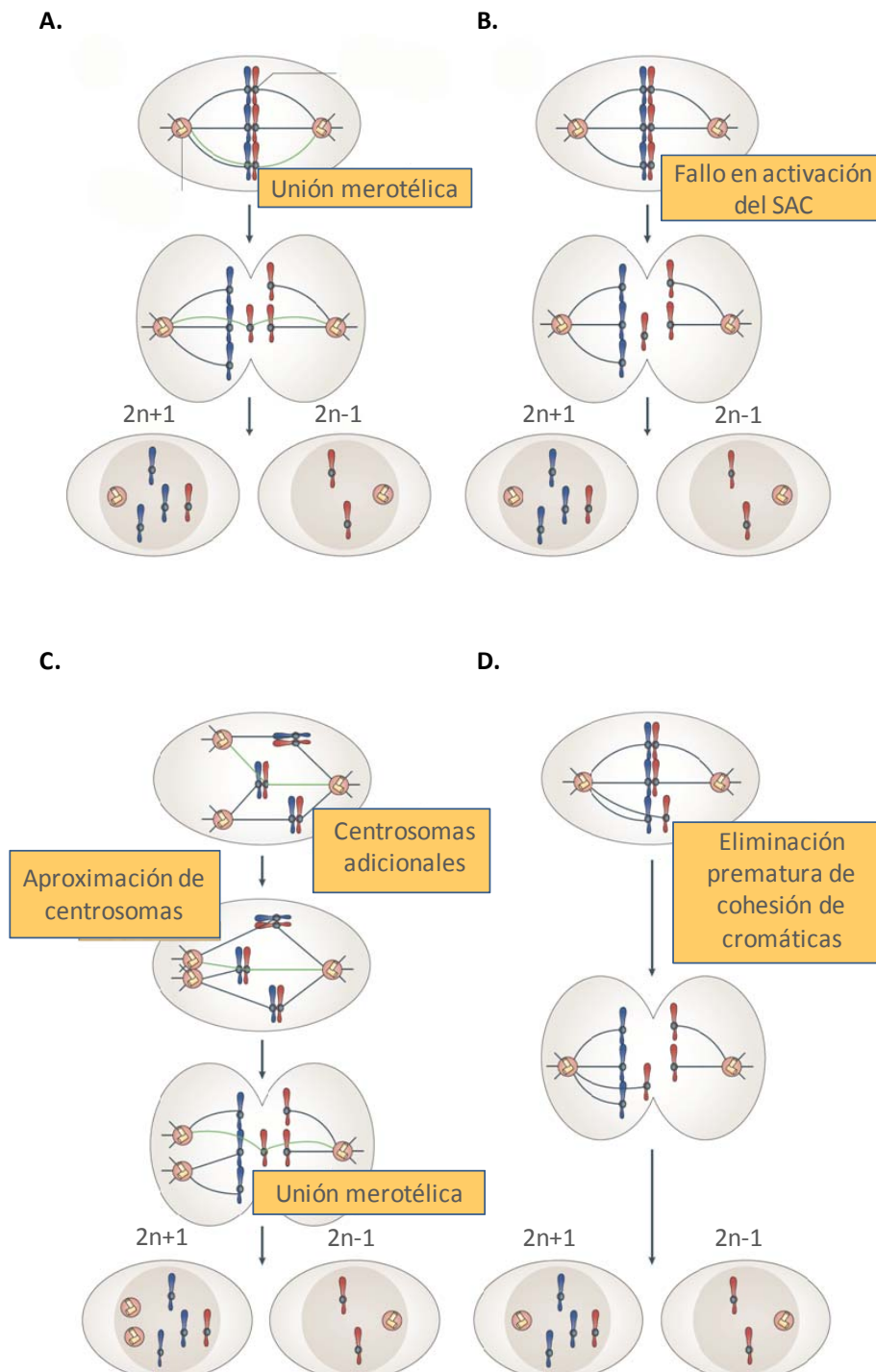


Figura 15: Orígenes de la aneuploidía. Existen varios mecanismos que provocan la aneuploidía en células. **(A)** Uniones merotéticas entre cinetocoros y microtúbulos. Si este error no se corrige, las dos cromátidas hermanas pueden viajar al mismo polo o permanecer en la zona intermedia del huso y ser

excluidos de las dos células hijas. **(B)** Centrosomas adicionales. La formación de husos pseudobipolares debido a la asociación de dos centrosomas en el mismo polo puede aumentar la frecuencia de uniones merotéticas. **(C)** Defectos en el SAC. Estos defectos permitirán una entrada prematura en anafase cuando no todos los cromosomas están unidos a microtúbulos de los polos opuestos. **(D)** Alteraciones en la cohesión de los cromosomas. Si la cohesión se pierde de forma prematura o si persiste durante anafase se originarán células aneuploides (modificado de Gordon et al., 2012).

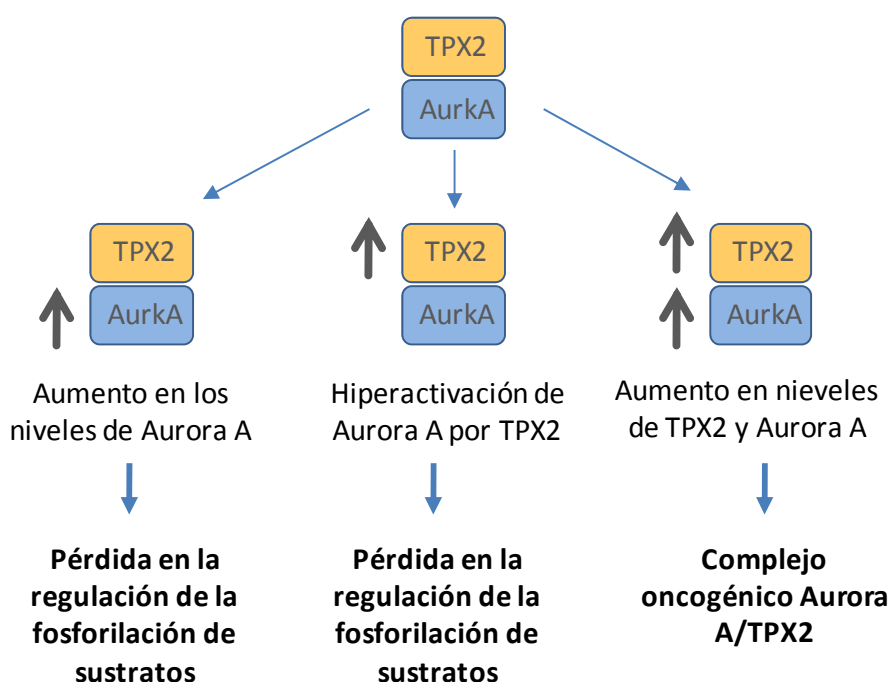


Figura 16: Alteraciones en la regulación de Tpx2 y Aurora A. Las alteraciones del complejo pueden suceder de tres maneras hipotéticas: el aumento de los niveles de Aurora A o de TPX2 dará lugar a la fosforilación descontrolada de los sustratos de Aurora A. Ambas proteínas pueden aparecer sobreexpresadas y actuar como un complejo (modificado de Asteriti et al., 2010).

El importante papel que Tpx2 cumple en la regulación del huso mitótico permite entender que las alteraciones en los niveles de expresión de este regulador mitótico sean causa de anomalías cromosómicas que estén a su vez asociadas con el origen y la progresión tumoral. Es, por tanto, sumamente importante entender de la mejor manera posible la función que Tpx2 juega en la regulación de la mitosis y los efectos que pueda tener su inactivación o eliminación

en los organismos superiores, tanto en un escenario patológico como en el desarrollo del individuo sano.

Tabla 1: Cánceres humanos que presentan alteraciones en los niveles de expresión de Tpx2.

Tipo de Cáncer	Alteración en Tpx2	Referencia
Meningioma	Amplificación	Stuart et al., 2011
Astrocitoma	Aumento en los niveles de proteína	Li et al., 2010
Carcinoma en glándulas salivares	Aumento en los niveles de RNAm	Shigeishi et al., 2009 a
Carcinoma oral	Aumento en los niveles de RNAm	Shigeishi et al., 2009 b
Carcinoma en células escamosas de pulmón	Sobreexpresión del gen Sobreexpresión de RNAm	Zhang et al., 2008 Lin et al., 2006
Trasformación maligna del epitelio respiratorio	Aumento en los niveles de proteína	Ma et al., 2006
Carcinoma en células no pequeñas de pulmón	Amplificación	Tonon et al., 2005
Adenocarcinoma de páncreas	Sobreexpresión del gen Amplificación	Warner et al., 2009 Tonon et al., 2005
Carcinoma hepatocelular	Aumento en los niveles de RNAm	Satow et al., 2010
Cáncer colorectal	Amplificación	Sillars-Hardebol et al., 2011
Carcinoma de ovario	Amplificación	Etemadmoghadam et al., 2010 Ramakrishna et al., 2010
Cáncer cervical	Sobreexpresión del gen	Bonatz et al., 2001 Scotto et al., 2008
Cáncer de células gigantes de hueso	Amplificación	Smith et al., 2006

OBJETIVOS

La finalidad principal de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento de las funciones de Tpx2 a nivel celular y durante el desarrollo de mamíferos, así como en la homeostasis de organismos superiores adultos y en su posible papel en el inicio y el desarrollo de tumores. Para ello, hemos generado un modelo de ratón condicional deficiente en la expresión de Tpx2 que nos ha permitido abordar estas cuestiones tanto *in vivo* como *in vitro*.

Así pues, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Análisis del efecto de la eliminación de Tpx2 durante el desarrollo embrionario.
2. Estudio *in vitro* de los mecanismos mediante los cuales Tpx2 regula la progresión del ciclo celular.
3. Análisis del papel de Tpx2 en el inicio y el desarrollo de los procesos tumorales.
4. Análisis de los efectos de la eliminación de Tpx2 en mamíferos adultos.
5. Estudio de las posibles funciones no mitóticas de Tpx2.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones modificados genéticamente

Todos los ratones modificados genéticamente generados en este estudio se mantuvieron en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) atendiendo a la normativa ética y sanitaria provista por la Unión Europea.

Se realizó un seguimiento diario de todos los animales y fueron sacrificados cuando presentaron signos obvios de enfermedad de acuerdo con *Guidelines for Humane End Points for Animals* (Stokes et al., 2000).

1.1 Generación de ratones genéticamente modificados para Tpx2

Las células embrionarias de ratón TBV-2 (células ES 129S2; Clon D028B03) que presentan la inserción del vector condicional *gene trap* del gen Tpx2 fueron obtenidas del *German Gene trap Consortium* (GGTC). Mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de *polymerase chain reaction*), se determinó la posición exacta de la trampa en el intrón 2 del gen. Las células embrionarias fueron microinyectadas en blastocistos de ratón C57BL/6J.

Para el genotipado de los animales, se utilizó DNA extraído de la cola del animal y mediante PCR con los oligonucleótidos presentados en la Tabla 2.

1.2 Tratamientos y procedimientos

A continuación detallamos todos los procedimientos y tratamientos que han sido realizados en este trabajo utilizando animales mutantes para Tpx2. Todos los ensayos fueron aprobados previamente por el comité de bioética y bienestar del Instituto de Salud Carlos III.

1.2.1 Tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno

La eliminación condicional de Tpx2 en animales adultos se llevó a cabo mediante inyección intraperitoneal de 4-OHT o mediante la alimentación *ad libitum* de los animales con pienso complementado con 4OH-T (Harlan Laboratories Model). Los animales fueron observados diariamente y sacrificados bajo cualquier signo obvio de enfermedad.

1.2.2 Ensayo de tolerancia a glucosa

Con el objetivo de analizar la capacidad para metabolizar la glucosa en animales heterocigotos para Tpx2 se llevaron a cabo ensayos de tolerancia a la glucosa.

Se inyectaron intraperitonealmente 2 gr de glucosa (Sigma) por kilogramo de animal. A continuación, con ayuda de un glucómetro (*Accu-Chek*Aviva), se analizaron los niveles de glucosa en sangre extraída mediante una punción en la cola del ratón.

1.2.3 Análisis de sangre

Para obtener la analítica sanguínea completa, así como el perfil de enzimas hepáticas en ratones adultos se utilizaron discos de diagnóstico VetScan (Abaxis Veterinary Diagnostics) (200µl de sangre). Fueron analizados los siguientes parámetros: albúmina, fosfatasa alcalina, amilasa, urea, creatinina, globinas, glucosa, potasio, calcio, sodio, fósforo, proteína total, bilirrubina, fosfatasa alcalina, colesterol y alanina aminotransferasa.

1.2.4 Estudio histopatológico e inmuohistoquímico

En las necropsias de los ratones, tras una inspección macroscópica general externa e interna de las cavidades cefálica, torácica y abdominal para detectar posibles anomalías del desarrollo y/o patologías, se recogieron muestras de forma reglada de páncreas, estómago, intestino (delgado y grueso), hígado, riñones, glándulas adrenales, órganos reproductores, pulmón, corazón, timo, tiroides, bazo, ganglios linfáticos, cerebro, cerebelo, hipófisis y hueso,

así como de todos los tejidos con algún tipo de alteración morfológica. Las muestras de tejidos destinadas a estudio histopatológico se fijaron durante 24 horas en formol tamponado al 10% (Sigma) y tras su procesamiento fueron embebidas en parafina (Panreac).

Se realizaron cortes de 3-5 μm de espesor al micrótopo (Leica/Microm) y para su estudio microscópico rutinario se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) de acuerdo con los protocolos convencionales. Las preparaciones fueron analizadas junto a un patólogo experto (Dra. Marta Cañamero). En el caso de que fueran necesarias técnicas adicionales de inmunohistoquímica, se realizaron cortes de 3-5 μm , que tras ser desparafinados recibieron diferentes tratamientos de recuperación antigénica con calor, fueron incubados con los anticuerpos detallados en la Tabla 4, en un inmunoteñidor automático (Dako Autostainer plus o Discovery XT-Ventana-) y revelados con DAB.

1.2.5 Extracción, cultivo e inmunofluorescencia de embriones de ratón

Para la obtención de un mayor número de embriones por camada, las hembras fueron tratadas mediante inyección secuencial e intraperitoneal con gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG; Henry Schein España) y 48 horas más tarde con gonadotropina coriónica humana (hCG). Una vez inyectada esta última hormona, las hembras fueron puestas en cruce con machos heterocigóticos para el alelo mutante de Tpx2. Un día y medio después de la monta, los embriones fueron extraídos del oviducto en medio tamponado con HEPES (M2; Sigma) y lavados tres veces en el mismo medio. Los embriones fueron cultivados *in vitro* individualmente en medio suplementado con potasio, KSOM (Chemicon International Inc.) a una temperatura de 37°C y con 5% de CO₂ y fotografiados diariamente durante un total de 4 días. Para los análisis por inmunofluorescencia, los embriones fueron fijados con metanol frío durante 1 hora a -20°C, lavados en una solución de PBS y albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e incubados con 0,1% de Tritón X para permeabilizar las membranas. Los embriones fueron bloqueados en una solución de 10% de suero de ternera, 0,1% de BSA en PBS e incubados con los siguientes anticuerpos primarios durante 3 h a 37°C: α -tubulina, Tpx2, anticuerpo anti-centrómeros y DAPI para marcar el DNA. Tras lavar de nuevo los embriones en

una solución de PBS y BSA al 0.1%, se procedió a la incubación de los anticuerpos secundarios Alexa-488, Alexa-594 y Alexa-647 (Molecular Probes). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal ultra-espectral Leica TCS-SP2-AOBS-UV o Leica TCS-SP5.

2. Cultivos y ensayos celulares

Todos los cultivos celulares fueron mantenidos en medio DMEM (GIBCO) complementado con 10% o 15% de suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) y un cóctel antibiótico (penicilina y estreptomicina). Las células se mantuvieron en incubadores a una temperatura constante de 37C y con un 5% de CO₂.

2.1 Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, de *mouse embryonic fibroblast*) fueron obtenidos a partir de embriones de día E14.5 de desarrollo. Los embriones fueron aislados del útero y del saco vitelino. Una vez eliminada la cabeza y el hígado, el resto del embrión se disgregó con ayuda de una jeringuilla y se incubó en una solución de tripsina-EDTA (tripsina 0,5g/L, EDTA 0,2 g/L, NaCl 0,85 g/L). La suspensión de células obtenida tras este tratamiento, se sembró en una placa de cultivo de 150 mm de diámetro. Cuando los fibroblastos alcanzaron el 70% de confluencia (2-3 días después de la extracción), se recogieron las células y fueron congeladas en alícuotas en N₂ líquido.

2.2 Eliminación del gen *Tpx2* *in vitro*

Los fibroblastos embrionarios de ratón fueron transducidos con adenovirus (100 MOI) que expresan las recombinasas Cre o Flpe. Esta última se utilizó como control de infección sin efecto en los alelos mutantes de *Tpx2*.

Previo a la infección, los MEFs fueron sincronizados en G₀ mediante confluencia. Tras 72 horas en confluencia, los MEFs fueron tratados durante 48 horas con los adenovirus en presencia de DMEM con FBS al 0.1%. 48 horas después de la infección, se sembraron las células a baja densidad para estimular la entrada en el ciclo celular.

2.3 Ensayos de focos

Se transfectaron fibroblastos de ratón inmortalizados mutantes para Cdk4 R24C por el método de co-precipitación de DNA con fosfato cálcico. Se transfectaron las concentraciones correspondientes (2, 4 u 8ug) en cada muestra de los vectores de expresión de Tpx2, Aurora A, HRas V12 y el vector vacío. Seis horas después de la transfección, se lavaron las células dos veces con PBS-0,1% EDTA y una vez con PBS. A continuación las células se mantuvieron en cultivo en condiciones estándar. 24 horas después del lavado con PBS, las células fueron levantadas y plaqueadas de nuevo en una proporción 1:3 y se cambiaron a un medio DMEM suplementado con 5% de DCS (suero de ternera; del inglés *donor calf serum*). Tras 21 días en cultivo, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa para la cuantificación de los focos. Para alguno de los casos, los focos fueron aislados y mantenidos en cultivo como clones para llevar a cabo un seguimiento de aneuploidías.

2.4 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Para el análisis por citometría de flujo, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con etanol al 70% durante 12 horas.

Para el marcaje del DNA, las células fueron teñidas con yoduro de propidio (20ug/ml; Sigma) en presencia de RNAasa A (0,2 mg/ml; Quiagen) durante 30 minutos a 4°C y analizadas más adelante en un citómetro de flujo (FACs Canto; Becton-Dickinson). Para el análisis de las poblaciones celulares se utilizó el software FlowJO 7.6.1.

2.5 Análisis de polimerización de microtúbulos

Los fibroblastos fueron incubados en presencia de nocodazol (100ng/ml) durante 6 horas. Las células sembradas sobre cubres, fueron transferidas e incubadas durante 40 minutos en medio suplementado con Hepes (10mM) a pH7.25 y enfriado en hielo para asegurar la completa despolimerización de los microtúbulos. Tras este procedimiento las células fueron transferidas de nuevo a un medio con la misma composición pero a una temperatura de 37°C para inducir la polimerización de las fibras. Tras incubaciones de 1, 3, 7 y 10 minutos, las células

fueron fijadas inmediatamente en metanol frío. Para los análisis por inmuofluorescencia, se llevó a cabo un lavado en PBS para retirar el metanol sobrante y se bloquearon las células en una solución de PBS y suero de ternera al 10%. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: α -tubulina, CREST y Tpx2, así como anticuerpos secundarios Alexa-488, 594 y 647 en las condiciones especificadas en las Tablas 3 y 4. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio DeltaVision RT (Applied Precision, LLC; IX70/71; Olympus)

2.6 Ensayo de estabilidad de las fibras-k

Los fibroblastos sembrados sobre cubre-objetos fueron transferidos e incubados durante 3 minutos en medio DMEM con FBS al 10% suplementado con Hepes (10mM) enfriado en hielo con el objetivo de despolimerizar las fibras menos estables del huso mitótico. Tras este tratamiento las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 7 minutos y permeabilizadas con metanol. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: α -tubulina, CREST y Tpx2, así como anticuerpos secundarios Alexa-488, 594 y 647 en las condiciones especificadas en la Tabla 3. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio DeltaVision RT (Applied Precision, LLC; IX70/71; Olympus)

2.7 Inmunofluorescencia

Las células fueron fijadas y permeabilizadas con metanol. Tras un lavado en una solución de PBS y Tritón X-100 al 0,03%, las células fueron bloqueadas con suero de ternera al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios en incubaciones de 1 hora a 37°C: quinasa Aurora A (1:250), Eg-5 (1:200), Kif5, α -tubulina, γ -tubulina (1:200). Tras tres lavados en PBS y Tritón X-100 al 0,003% las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios: Alexa-488, 594 y 647 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Estas preparaciones se montaron en medio ProLong® suplementado con DAPI (Invitrogen). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal ultra-espectral Leica TCS-SP5.

2.8 Videomicroscopía

Para el seguimiento de la entrada y salida de mitosis de células individuales por videomicroscopía, generamos líneas celulares que expresan la histona H2B fusionada a proteína fluorescente roja (RFP, de *red fluorescent protein*) para el marcar el DNA. Para ello, las células fueron transducidas con un vector lentiviral que expresa H2B fusionada a mRFP (del inglés *mouse red fluorescent protein*) (HIV-H2BmRFP; Kanda et al. 1998). Tras la delección del gen de Tpx2 mediante el protocolo detallado en el apartado 2.2 de esta sección, las células fueron sembradas en placas de fondo de cristal (MaTek Corporation) y comenzó la filmación 14 horas después de la estimulación de entrada en ciclo. Se tomaron imágenes en intervalos de 10 minutos usando un objetivo 20X PlanApo N 1.42 N.A en un microscopio DeltaVision RT (Applied Precision, LLC; IX70/71; Olympus) equipado con una cámara CoolSNAP HQ (Roper Scientific). El análisis de los vídeos fue llevado a cabo con el software LAS-AF Lite (Leica).

2.9 Extracción y cultivo de células del bazo

Para el cariotipado de células procedentes de bazos sanos y tumorales, se procedió a la necropsia de los ratones y se mantuvo el bazo en PBS. Con la ayuda de un tamiz celular (40µm; Becton-Dickinson), se disgregó y homogeneizó el tejido lo máximo posible. Se plaqueó un total de 10^7 células en placas de 6 pocillos para mantener las células en alta densidad. Con objetivo de activar el ciclo celular, los esplenocitos fueron incubados en medio RPMI (GIBCO) en presencia de lipopolisacárido (LPS; del inglés *lipopolysaccharide* 25ug/ml) durante 72 horas. Tras esta incubación, las células fueron tratadas con colcemida (Solución KryoMAX™ de Gibco) (0,1ug/ml) durante 4 horas lo que permitió detener el ciclo en la metafase de mitosis. Para la obtención de preparaciones cromosómicas se siguió el protocolo que detallamos en el siguiente apartado.

2.10 Esparcido cromosómico

Las células recibieron un tratamiento hipotónico durante 5 minutos con una mezcla de 40% DMEM/ 60% agua. Este tratamiento hipotónico se interrumpió añadiendo a la suspensión celular un volumen idéntico de solución de Carnoy (75% metanol puro, 25% ácido acético glacial). Tras una centrifugación de 10 minutos a 1000rpm, las células fueron resuspendidas y fijadas en la misma solución de metanol y ácido acético durante 10 minutos. Una vez fijadas, las células se lanzaron sobre un portaobjetos, previamente tratados con ácido acético al 45%, desde una altura de 10-15 cm. Finalmente, las preparaciones se montaron en medio ProLong® suplementado con DAPI (Invitrogen) para la tinción de los cromosomas. Se tomaron imágenes en un microscopio Leica D3000 y un objetivo 60X PlanApo N 1.42 N.A. Se procedió al conteo de cromosomas con ayuda del software *Image J*.

El cariotipo espectral (SKY) de las células de ratón fue llevado a cabo por el Grupo de Citogenética Molecular del CNIO dirigido por el Dr. Juan Cigudosa.

2.11 Captación de [3H]-2-deoxy-D-glucosa

Un día después de sembrar las células en placas de 6 pocillos (2×10^5 células/pocillo), fueron lavadas e incubadas durante 2 horas con medio DMEM (Gibco) sin suero con el objetivo de eliminar la glucosa endógena. Se lavaron las células dos veces con tampón Krebs Ringer HEPEs (KRH: 120mM NaCl; 4,7mM KCL; 2,2mM CaCl₂; 10mM HEPEs; 1,2mM KH₂PO₄; 1,2mM MgSO₄; pH7,4) previamente filtrado. Se incubaron las células en presencia de KRH durante 20 minutos a 37°C. Se añadió 1ml de [3H]-2-deoxy-D-glucosa (Perkin Elmer NET549A001) (4uCi por ml) a durante distintos tiempos: 15 minutos, 1, 2 y 3 horas. Tras este tiempo de espera, lavamos las células con tampón KRH frío. Las células fueron lisadas con 0,6ml de NaOH 10M. Se mezclaron 200ml del lisado con 5ml del líquido de centelleo. Estas muestras se mantuvieron a -20°C durante toda la noche. 12 horas después se realizaron las medidas en un contador de centelleo. A modo de control, se analizó también la cantidad de [3H]-2-deoxy-D-glucosa remanente en el sobrenadante. Así mismo, analizamos la captación de glucosa en células tratadas con Citocalasina B, conocido inhibidor de los transportadores de glucosa (Taverna et

al., 1973). Los resultados fueron normalizados contra la concentración de proteína presente en cada lisado.

3. Ensayos bioquímicos

Detallamos a continuación todos los análisis bioquímicos que se llevaron a cabo en este proyecto y que han sido incluidos en esta memoria.

3.1 Inmunoprecipitación e inmunodetección (*western blot*)

Para la extracción de proteínas, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en una solución que contenía 37mM NaCl, 0,5% de NP-40, 20mM Tris-HCl pH7.4, 2mM EDTA, 10% glicerol, 0,5mM de DTT y una mezcla comercial de inhibidores de fosfatasas y proteasas (Sigma). Para la inmunoprecipitación, los lisados celulares se incubaron a 4°C 15 minutos con esferas de sefarosa recubierta de proteína G, para anticuerpos monoclonales (anti-GFP), o proteína A para anticuerpos policlonales (anti-Tpx2) o A (Amersham). Se centrifugaron los lisados a 13000 rpm y 4°C para retirar las esferas. Los sobrenadantes obtenidos, se incubaron con 5ug de anticuerpo anti-V5 (ratón monoclonal; Invitrogen) o 5ug de anticuerpo anti-Tpx2 (generado en el laboratorio del Dr. Anthony Hyman, Dresden). Tras 1 hora de incubación a 4°C en presencia del anticuerpo, se añadieron 30ul de esferas de sefarosa sobre cada lisado y se incubó esta mezcla durante 2 horas a 4°C. Se centrifugaron las muestras y se hicieron tres lavados con una solución que contenía 37mM NaCl, 0,5% de NP-40, 0,1% SDS, 1% TX-100, 20mM Tris-HCl pH7.4, 2mM EDTA, 10% glicerol, 0,5mM de DTT y una mezcla comercial de inhibidores de fosfatasas y proteasas (Sigma).

La extracción de proteína se realizó con solución Laemmli (Tris pH6,8 60mM; SDS al 2%; glicerol al 10%) con el objetivo de extraer tanto proteínas citoplasmáticas como nucleares. Después de la electroforesis, las proteínas fueron separadas en geles de acrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad), mediante transferencia húmeda, utilizando una fuente Trans-Blot de BioRad. Estas membranas fueron bloqueadas con leche al

5% en PBS-Tween 20 al 0,05% y se sometieron a inmunodetección usando los anticuerpos que se detallan en la Tabla 2.

3.2 Fraccionamiento citosólico y nuclear

Se recogieron las células del cultivo con ayuda de una espátula y se resuspendieron en tampón (HEPES 10mM, KCl 1mM, MgCL₂ 1,5mM y glicerol al 10%) en una proporción 5:1 con respecto al volumen celular (500µl para un total de 100µm de células). Tras añadir Tritón-X-100 al 0,1% y una incubación de 5 minutos en hielo, se centrifugaron las muestras durante 4 minutos a 3.500 revoluciones por minuto (rpm). Como resultado de esta centrifugación, el sobrenadante correspondía ya a la porción citosólica y el pellet a la fracción nuclear. El sobrenadante se centrifugó durante 15 minutos a 13.500 rpm y se mantuvo congelado a -20°C. Se hizo un lavado de la fracción nuclear y se centrifugó durante 4 minutos a 3.500 r.p.m. El pellet resultante se resuspendió en tampón Laemmli en un volumen total igual al que contenía la fracción citosólica

3.3 Ensayos de transcripción inversa y PCR cuantitativa

La extracción de mRNA tanto de células como de tejidos, se llevó a cabo con trizol (TRIZOL Reagent; GIBCO). Para la homogeneización de tejidos y células se incubaron las células durante 5 minutos con 500 µl de trizol para asegurar la disociación completa de los complejos nucleoprotéicos. Para la separación de la fase proteica y la ribonucleica, se añadieron 100 µl de cloroformo y tras mezclar bien la preparación e incubarla 3 minutos en hielo, se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 rpm. Se recuperó la fase acuosa que contenía el RNA y se llevó a cabo la precipitación del mismo añadiendo 250µl de isopropanol en incubando las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar las muestras durante 10 minutos a 4°C y una velocidad de 12000 rpm, el pellet se lavó con etanol al 70% y se resuspendió el RNA resultante en 100 µl de agua sin DNAasas. Para la reacción de transcripción inversa y PCR cuantitativa se utilizó el kit comercial SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step q-RT-

PCR with ROX (Invitrogen) con los siguientes oligos: Tpx2-qRT-F1 5'-CCTCACAGATGAGCGAATCA-3'; 5'-Tpx2-qRT-R1 TCTTCCCTTTGGACAGGTTG-3'.

3.4 Ensayos de luciferasa

Para analizar los niveles de transcripción de distintos genes se utilizó el reportero luciferasa. Se sincronizaron los MEFs de ratón siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2. Las células fueron nucleofectadas con AMAXA (MEF-1; Programa A-23) con 4ug de distintos vectores de expresión que contenían el gen de luciferasa bajo el control de diversos promotores (c-fos, c-jun, AP-1, Sre, p19). Se utilizaron 4ug del vector normalizador (Promega) que contenía luciferasa de *Renilla*. El análisis se llevó a cabo 16 horas después de la entrada en ciclo (Figura 50). Preparamos las células utilizando el kit comercial *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) y se llevaron a cabo las medidas un luminómetro (Promega).

4. Estudio de tumores humanos

Los estudios con tumores humanos se llevaron a cabo en colaboración con distintas instituciones: (1) las muestras de cáncer de ovario y mama proceden del Hospital La Paz de Madrid (Dr. David Hardison); (2) las muestras de cáncer de colon proceden del Hospital de Santa Creu y Sant Pau de Barcelona (Dr. Gabriel Capellá); (3) las muestras de mieloma fueron cedidas por el Dr. Juan Cigudosa (CNIO); (4) las muestras de linfomas tipo Hodking proceden de MD Anderson Cancer Center de Madrid (Dr Juan Fernando García).

4.1 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Este procedimiento fue llevado a cabo por el Grupo de Citogenética Molecular del CNIO, a partir de muestras embebidas en parafina. Tras la desparafinización, las muestras fueron fijadas en etanol y se siguió el protocolo estándar para muestras tumorales humanas. Las sondas utilizadas fueron contra los cromosomas 7 (marcado en verde) y 20 (marcado en rojo).

5. Tablas de reactivos

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los ratones y fibroblastos embrionarios de ratón.

Alelo	Nombre	Secuencia	Tamaño
<i>Tpx2</i> (+)	Tpx2_D028B03_F2	GAATTCAGAGGCCAGACAG	232 pb
	Tpx2_D028B03_R2	GAGTTCCAGGACAGCCAGAG	
<i>Tpx2</i> (-)	Tpx2_D028B03_F2	GAATTCAGAGGCCAGACAG	456 pb
	Tpx2_D028B03_R1	CTCCCGAAAACCGCTTCTA	
<i>Tpx2</i> (lox)	Tpx2_D028B03_F3	TTCTCTGCATAGCCCAAGGT	804 pb
	Tpx2_D028B03_R3	ACCTTGGGCTATGCAGAGAA	
<i>Tpx2</i> (Δ)	Tpx2_D028B03_F3	TTCTCTGCATAGCCCAAGGT	714 pb
	B32	CAAGGCGATTAGTTGGGTAACG	

Tabla 3: Anticuerpos Secundarios.

Anticuerpo Secundario	Tipo	IF	Proveedor
Alexa Fluor®-488	Cabra Anti-Ratón IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-488	Pollo Anti-Conejo IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-488	Pollo Anti-Rata IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-594	Cabra Anti-Ratón IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-594	Pollo Anti-Conejo IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-594	Cabra Anti-Human IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-594	Pollo Anti-Rata IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-647	Cabra Anti-Human IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-647	Pollo Anti-Conejo IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-647	Pollo Anti-Ratón IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen
Alexa Fluor®-680	Cabra Anti-Ratón IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen

Tabla 4: Anticuerpos primarios utilizados.

Antígeno	Fuente (Ig)	Clon	IF	WB	IHQ	Proveedor
AKT	Conejo (P)	--	1:250	1:500	--	Cell Signalling
Anti-centromere Antibody	Humano (P)	--	1:100	--	--	Antibodies Inc.
α -tubulina	Rata (M)	YL1/2	1:1000	--	--	ECACC
α -tubulina	Ratón (M)	DM1A	1:1000	--	--	Sigma
β -actina	Ratón (M)	AC-15	--	1:1000	--	Sigma
Caspasa 3 Activa	Conejo (P)	--	--	--	1:200	RYS systems
Centrosomal protein 135kDa	Conejo (P)	--	1:500	--	--	Dr. Hyman
CREST	Human (P)	--	1:500	--	--	Dr. Hyman
ERK	Conejo (P)	--	1:250	1:250	--	Cell Signalling
Fosfo-AKT	Conejo (P)	--	1:250	1:500	--	Cell Signalling
Fosfo-ERK	Conejo (P)	--	1:250	1:500	--	Cell Signalling
Fosfo-Histona H2A.X (Ser 139)	Ratón (M)	JBW301	--	--	1:100	Millipore
Fosfo-Histona H3 (p-H3)	Conejo (P)	--	--	--	1:100	Millipore
γ -tubulina	Ratón (M)	T 6557	1:1000	--	--	Sigma
Ki67	Rata (M)	TEC-3	--	--	1:100	DAKO
Quinesina 11 (Eg5)	Conejo (P)	--	1:250	--	--	Dra. Arlot-Bonnemains
Quinesina 15 (Kif15)	Conejo (P)	--	1:250	--	--	Dra. Vernos
MAD2L1 (Mad2)	Ratón (M)	2G9	1:500	1:500	--	MBL
Quinasa Aurora A (AurkA)	Ratón (M)	35C1	1:250	--	--	AbCam
IR β	Conejo (P)	--	1:250	1:1000	--	Dr. Brazil
IRS-1	Conejo (P)	--	--	1:1000	--	Dr. Brazil
Tpr	Ratón (M)	ab58344	1:500	1:500	--	AbCam
TPX2	Conejo (P)	--	1:500	1:500	--	Dr. Hyman
TPX2	Conejo (P)	--	1:250	1:500	1:500	LifeSpan
TPX2	Ratón (M)	18D5-1	1:500	--	--	AbCam
TPX2	Conejo (P)	--	1:500	1:500	--	Dr. Hyman
Vinculina	Ratón (M)	hVIN-1	--	1:1000	--	Sigma

Policlonal; M: Monoclonal; IF: inumofluorescencia; WB: *western blot*; IHQ: inmunohistoquímica.

Resultados

1. Generación de un modelo de ratón deficiente en Tpx2

Hasta el comienzo de esta tesis los estudios de la función de Tpx2 centrados en su papel en la regulación de ciclo celular se habían basado en la utilización de *Xenopus Laevis* y células humanas como organismos modelo. En estos casos, las aproximaciones utilizadas eran el uso de RNA interferente pequeño (siRNA, del inglés *small interference RNA*) y anticuerpos para la inactivación de proteínas. Por ello, consideramos necesario el análisis del papel de esta proteína *in vivo* utilizando un modelo animal de mamíferos que nos permitiera eliminar genéticamente este regulador mitótico. Así pues, con este objetivo, hemos generado un modelo de ratón condicional deficiente en la expresión de Tpx2. Para ello utilizamos la estrategia de la trampa génica (*gene trap*) basada en la inserción en el genoma de un vector retroviral condicional [rFlipROSAbeta-Geo (Cre)]. En nuestro caso, la inserción tuvo lugar en el intrón 2 del gen de Tpx2. El vector en cuestión está compuesto de un sitio de corte y empalme (SA del inglés *splice acceptor*), la fusión de los genes beta-galactosidasa y neomicina (β -geo) y una secuencia de poliadenilación como señal para finalizar la transcripción (Figura 17). Esta construcción está organizada en un *cassette* insertado en la estructura de un vector que carece de promotores y potenciadores (Friedrich and Soriano, 1991).

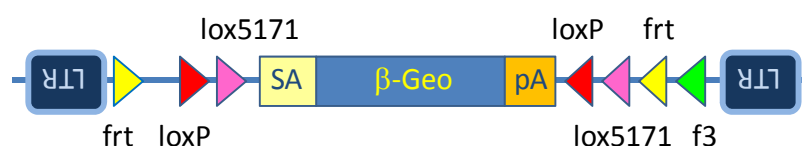


Figura 17: Cassette de trampa génica. Esquema representativo del fragmento procedente del vector rFlipROSAbeta-Geo (Cre) insertado en el intrón 2 del gen de Tpx2. Los sitios marcados con triángulos, frt (amarillo), f3 (verde), loxP (rojo) y lox5171 (rosa), son secuencias de reconocimiento de las recombinasas Flip y Cre; LTR (del inglés *long terminal repeat*); SA (*splice acceptor*); β -geo (fusión de los genes β galactosidasa y neomicina); pA (señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina)

El *cassette* está flanqueado por secuencias *frt* y *loxP*, salvajes o mutadas, que permiten su inversión en presencia de las recombinasas *Flip* o *Cre* respectivamente. Este sistema nos permite trabajar con tres tipos de alelos. Nos referiremos al alelo *Tpx2*(-) como aquel en el que la expresión del transcrito está impedida por la presencia del *cassette* SA β geopA. La expresión de la recombinasa *Flip* da lugar al alelo condicional o *Tpx2*(lox), en el que los niveles de expresión son comparables a los del alelo salvaje. Este alelo condicional es modificado por la recombinasa *Cre* dando lugar al alelo mutado *Tpx2*(Δ) en el que la expresión del transcrito se ve truncada. Debido a la pérdida de sitios *frt* y *lox*, este último alelo ya no es susceptible a más recombinación.

El genotipado de los animales se llevó a cabo siguiendo el protocolo especificado en el punto 1.1 del apartado de Materiales y Métodos.

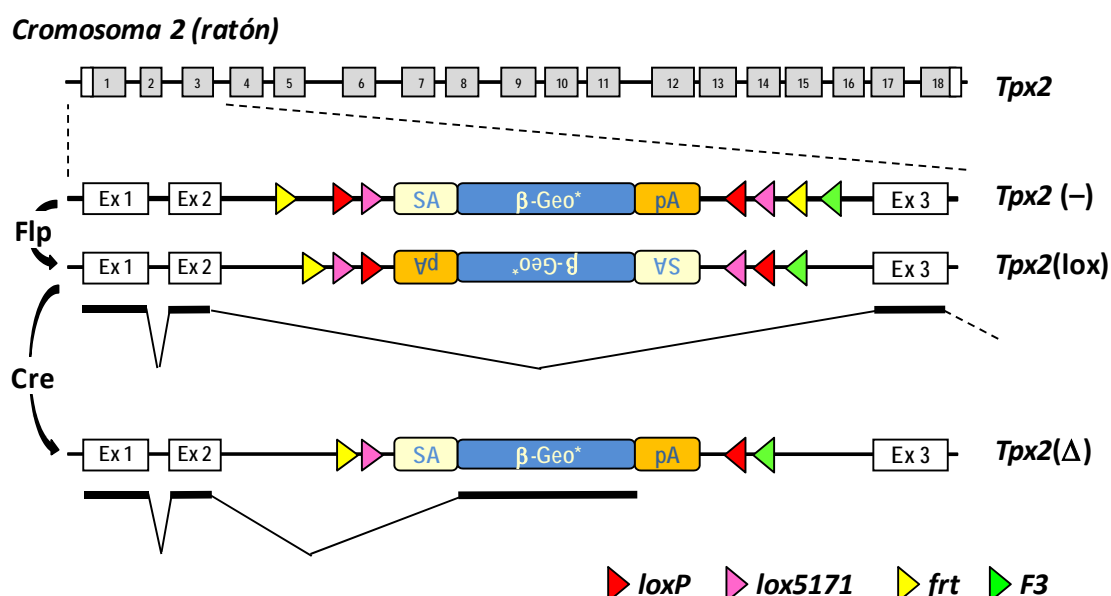


Figura 18: Inactivación de *Tpx2* mediante el *cassette* SA β geopA. El esquema muestra el *cassette* flanqueado por sitios diana para las recombinasas. En el caso del gen de *Tpx2*, esta integración tiene lugar en el intrón 2. Los transcritos (barras negras) que se inician desde el promotor endógeno (exón 1), se unen desde el sitio donador hasta el sitio de corte y empalme o aceptor (SA) del *cassette* SA β geopA. De esta manera, el gen reportero β -geo es expresado y el transcrito endógeno se termina

prematuramente en la secuencia pA dando lugar a la proteína mutada [*Tpx2*(-)]. En presencia de la recombinasa FIp, el *cassette* es invertido y pasa a ser codificante de nuevo [*Tpx2*(lox)], gracias a la inversión del sitio de corte y empalme. La pérdida de un sitio *frt* hace al nuevo alelo insensible a la expresión de la recombinasa FIp. Bajo la expresión de la recombinasa Cre, los sitios *lox* son reconocidos y el *cassette* se invierte de nuevo dando lugar a una forma no codificante [*Tpx2*(Δ)].

Las células embrionarias con la trampa génica (clon D028B03) se obtuvieron del *German Gentrap Consortium* (GGTC; <http://genetrap.gsf.de/>). Se trataba de células embrionarias de ratón TBV-2 [Células ES 129S2 (anteriormente 129/SVPas)]. Para determinar la localización genómica exacta de la inserción, llevamos a cabo ensayos de PCR (*polymerase chain reaction*; ensayos en cadena de la polimeasa) con varios oligonucleótidos específicos del intrón 2, en combinación con un oligonucleótido reverso situado en el gen de la beta-galactosidasa (Figura 18 y figura 19). Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados para, de esta forma, determinar la posición exacta de la inserción del *cassette* que se encuentra a 6.496 pares de bases bajo el exón 2 y 5.685 pares de bases sobre el exón 3 (Figura 19)

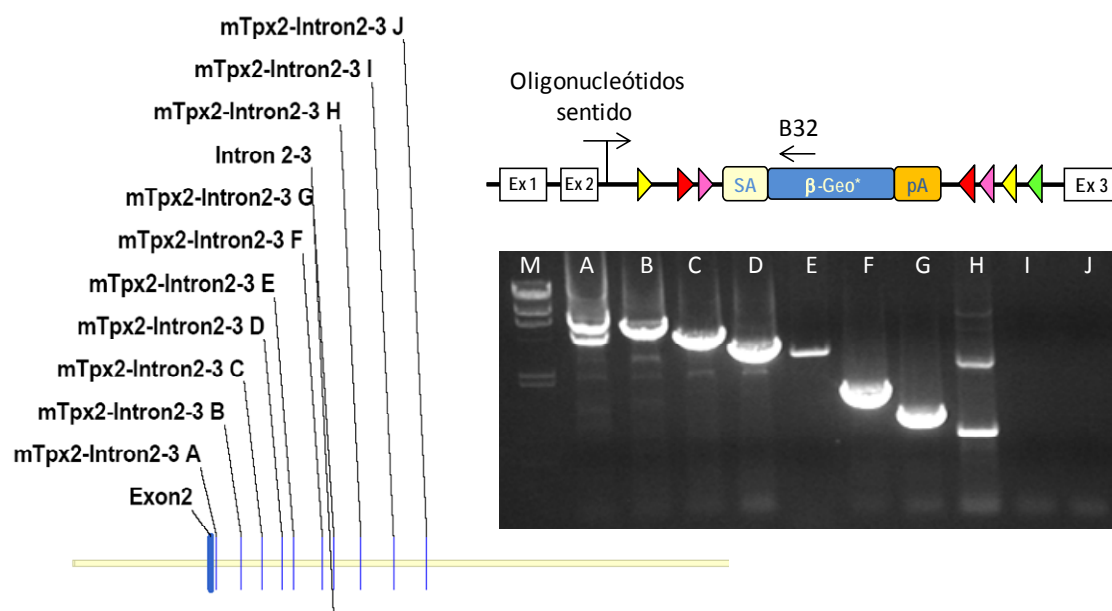


Figura 19: Localización genómica del cassette SA β geopA en el cromosoma 2 de ratón. Para determinar la posición exacta del inserto, se llevaron a cabo reacciones de PCR mediante la combinación de distintos oligonucleótidos sentido situados de forma consecutiva en el intrón 2-3 del gen de Tpx2 en combinación con un oligonucleótido antisentido (B32) situado en el gen β -geo. El diagrama de la izquierda representa la disposición de los oligonucleótidos sentido situados en el intrón 2-3. Los fragmentos de PCR fueron secuenciados y pudimos demostrar que el *cassette* estaba insertado entre los oligonucleótidos G y H.

Una vez validadas las células embrionarias de ratón que portaban la mutación, procedimos a la generación de ratones quiméricos para Tpx2 mediante microinyección de dichas células en blastocistos de ratón de fondo genético C57BL/6J. Se obtuvieron seis quimeras con 100% quimerismo y cinco de ellas fueron utilizadas como fundadores de la colonia. Para ello se establecieron cruces entre las quimeras y ratones salvajes de fondo genético C57BL/6J con el objetivo de obtener ratones heterocigóticos para la mutación en el gen de Tpx2 [Tpx2(+/-)].

2. Tpx2 es indispensable durante el desarrollo embrionario del ratón

Con el objetivo de estudiar las consecuencias de la pérdida de expresión de Tpx2 *in vivo*, establecimos cruces entre ratones Tpx2(+/-) y analizamos su descendencia. Ninguna de las 100 crías analizadas resultó ser homocigótica para la mutación en Tpx2 (Figura 20A). De este modo, demostramos que la expresión de esta proteína es esencial para la viabilidad de los embriones de ratón.

Para poder determinar el momento exacto de la muerte de dichos embriones, analizamos varias camadas en distintas etapas del desarrollo embrionario. De las 68 crías analizadas entre los días E8.5 y E17.5 del desarrollo, no encontramos ningún embrión Tpx2(-/-) (Figura 20A). La ausencia de embriones homocigóticos en las etapas intermedias y finales del desarrollo embrionario nos hizo acudir al análisis de las etapas más tempranas del desarrollo, esto es, etapas previas a la implantación en el útero. Para ello, extrajimos embriones en estadio E1.5 y los mantuvimos en cultivo *in vitro* hasta que alcanzaron la fase de blastocisto

(3-4 días). Pudimos observar que, mientras los embriones salvajes para *Tpx2* eran capaces de desarrollarse con normalidad hasta alcanzar la etapa de blastocisto, los embriones *Tpx2*(-/-) únicamente alcanzaban la fase de mórula compactada, muriendo finalmente tras 4 días de cultivo *ex vivo* (Figura 20B).

Con el objetivo de caracterizar este fenotipo en profundidad y entender el papel crucial que *Tpx2* jugaba en las etapas más tempranas del desarrollo de ratón, realizamos estudios de inmunofluorescencias en embriones mantenidos en cultivo durante uno (mórula temprana), dos (mórula compactada) y tres días (blastocisto).

A.

Tpx2 (+/-) x *Tpx2* (+/-)

	Genotipos observados			Genotipos esperados		
	(+/+)	(+/-)	(-/-)	(+/+)	(+/-)	(-/-)
Animales nacidos	42	58	0	25	50	25
Embriones E8.5-E17.5	27	41	0	17	34	17

B.

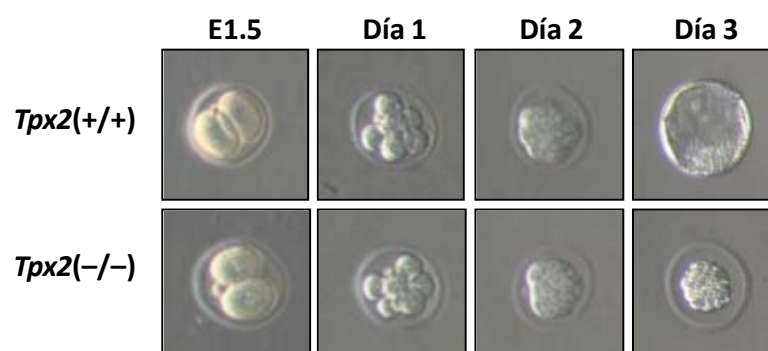


Figura 20: Letalidad embrionaria temprana en ausencia de *Tpx2*. (A) Número observado y esperado de animales nacidos o embriones procedentes de cruces entre *Tpx2*(+/-). (B) Cultivo *ex vivo* de embriones procedentes de cruces entre *Tpx2*(+/-). Los embriones fueron extraídos en estadio embrionario E1.5 del desarrollo y mantenidos en cultivo durante tres días adicionales

Aquellos embriones que fijamos tras un día en cultivo *in vitro*, presentaron dos fenotipos mayoritarios. Un primer fenotipo, más agresivo, se caracterizó por la presencia de embriones que no progresaron más allá de dos células debido a alteraciones en la formación del huso mitótico (Figura 21). También observamos mórulas cuyas células presentaban aberraciones en la morfología del núcleo (Figura 21, flecha blanca). En otros casos, los embriones *Tpx2*(-/-) progresaron hasta dar lugar a mórulas que presentaron alteraciones evidentes en la formación del huso mitótico.

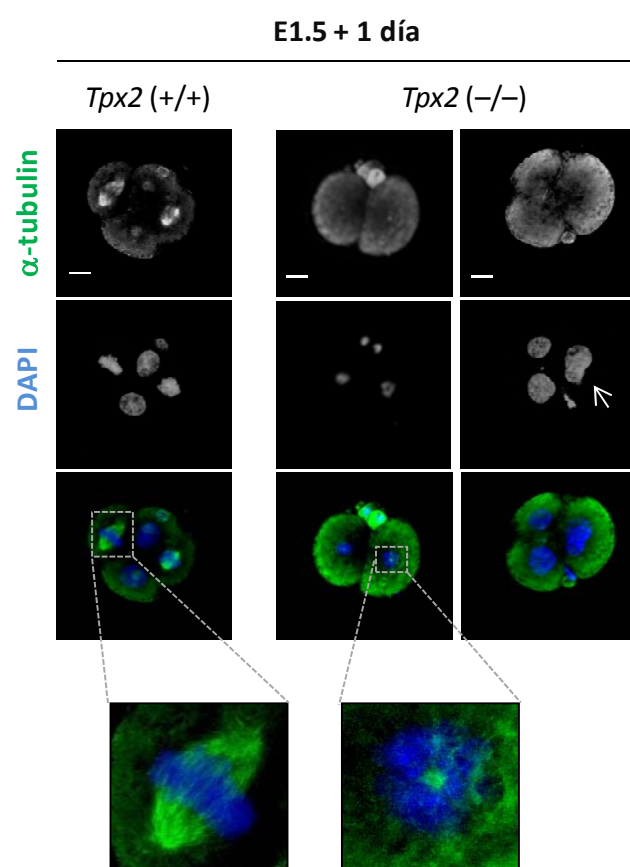


Figura 21: Anomalías en el huso mitótico de los embriones deficientes para *Tpx2*. Análisis por microscopía confocal de inmunofluorescencias en embriones E1.5 mantenidos en cultivo durante 1 día. A. Los embriones *Tpx2*(+/+) se encuentran en estadio de mórula temprana con células mitóticas normales. Los embriones deficientes para *Tpx2* (izquierda) presentan alteraciones en la formación del huso así como aberraciones nucleares (flecha blanca). Se muestra el detalle de una de las células que presentó un huso mitótico monopolar. En verde, α -tubulina marca los microtúbulos. El DNA, marcado con DAPI, se muestra en azul. Barras de escala, 20 μ m

Los embriones *Tpx2*(+/+) presentaban células normales con husos mitóticos robustos y bipolares, así como cromosomas perfectamente alineados en la placa metafásica. Sin embargo, los embriones deficientes en la expresión de *Tpx2* presentaron evidentes

alteraciones en la estructura del huso mitótico. Estas células se caracterizaron por presentar husos monopolares o colapsados, así como estructuras de α -tubulina claramente aberrantes y sin polos definidos (Figura 22, paneles de la derecha). A pesar de ello, la cantidad total de α -tubulina presente en cada célula no se vio alterada en los embriones *Tpx2*(+/-) (Figura 22, gráfica).

Para determinar las consecuencias de las aberraciones mitóticas que encontramos en las mórulas tempranas, realizamos estudios de inmunofluorescencias en embriones mantenidos en cultivo durante dos días. En ese momento, los embriones *Tpx2*(+/+) se encontraban ya en fase de blastocisto con un blastocelo y una masa celular interna claramente distinguibles (Figura 20 y 23). Sin embargo, los embriones *Tpx2*(+/-) permanecían en estado de mórula (8-12 células) con aberraciones nucleares en morfología y tamaño. Tanto los embriones *Tpx2*(+/+) como los homocigóticos para la mutación alcanzaron la fase de mórula compactada. Sin embargo, mientras que los embriones salvajes presentaban un número constante de 18 blastómeros por mórula, los embriones deficientes para la expresión de *Tpx2* presentaban un número que variaba entre los 9 y los 13 blastómeros por mórula. Además, al analizar en detalle los núcleos en blastómeros salvajes y mutantes, pudimos demostrar que en el caso de los embriones *Tpx2*(-/-) los núcleos no sólo eran aberrantes, sino que presentaban un volumen significativamente mayor que los núcleos de embriones *Tpx2*(+/+) ($p < 0.005$) (Figura 23 A). Ambas características son reflejo de alteraciones en la segregación cromosómica.

Estos resultados demuestran que *Tpx2* es un gen esencial para la formación de un huso mitótico bipolar funcional y una correcta segregación de los cromosomas durante el desarrollo embrionario del ratón.

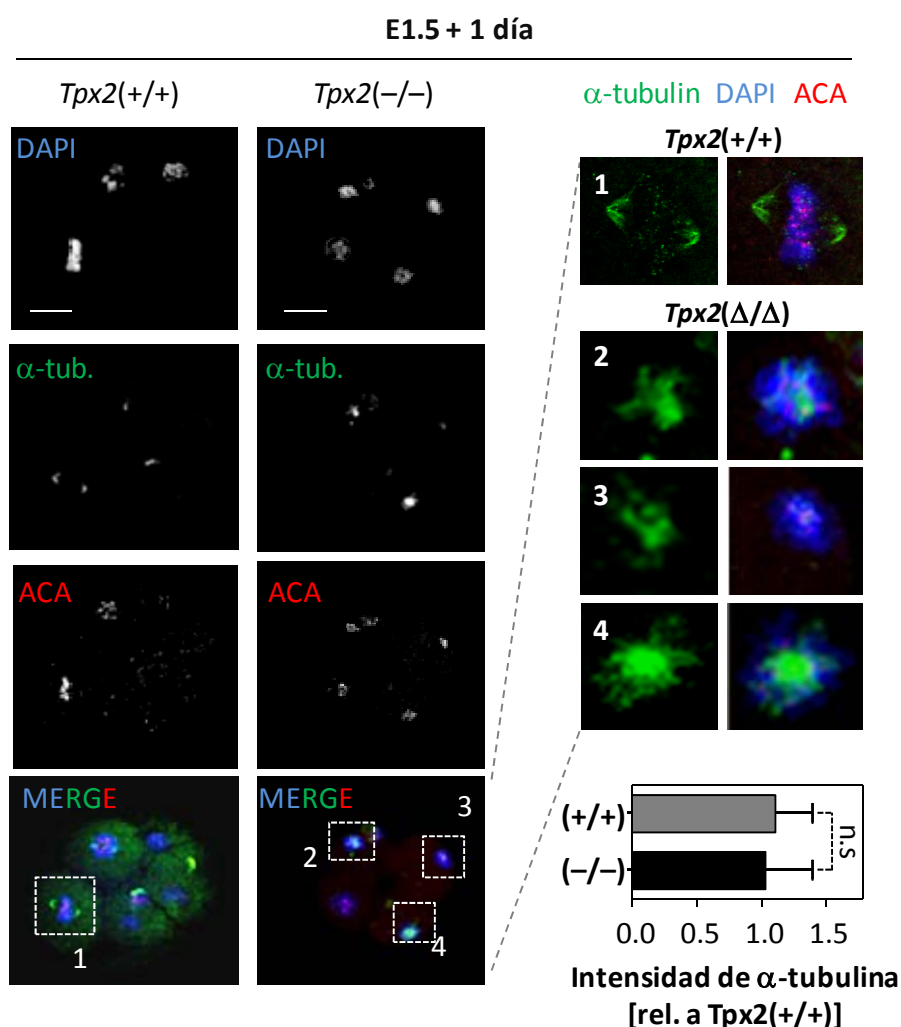
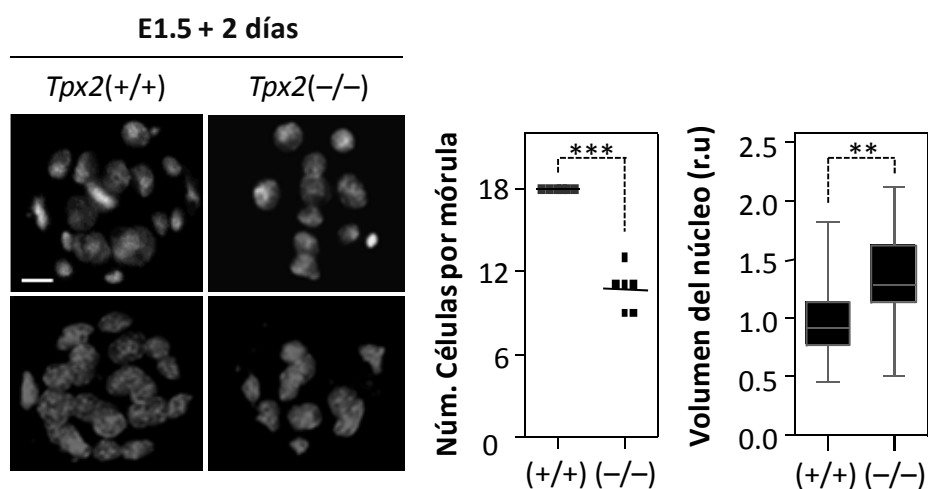


Figura 22: Anomalías en el huso mitótico de los embriones deficientes para *Tpx2*. Análisis por microscopía confocal de inmunofluorescencias en embriones E1.5 mantenidos en cultivo durante 1 día. Los embriones *Tpx2*(-/-) que alcanzaron la fase de mórula temprana presentan husos mitóticos aberrantes. Los paneles de la derecha son ampliaciones de las figuras mitóticas que se muestran en los paneles de la izquierda. El gráfico inferior muestra la intensidad de α -tubulina en los husos de embriones *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(Δ/Δ); no se encontraron diferencias significativas en este parámetro (n.s., $p > 0,05$). El DNA está marcado con DAPI, azul; ACA, en rojo, marca centrómeros. Los microtúbulos, en verde, fueron detectados con α -tubulina. Barras de escala, 20 μ m.

A.



B.

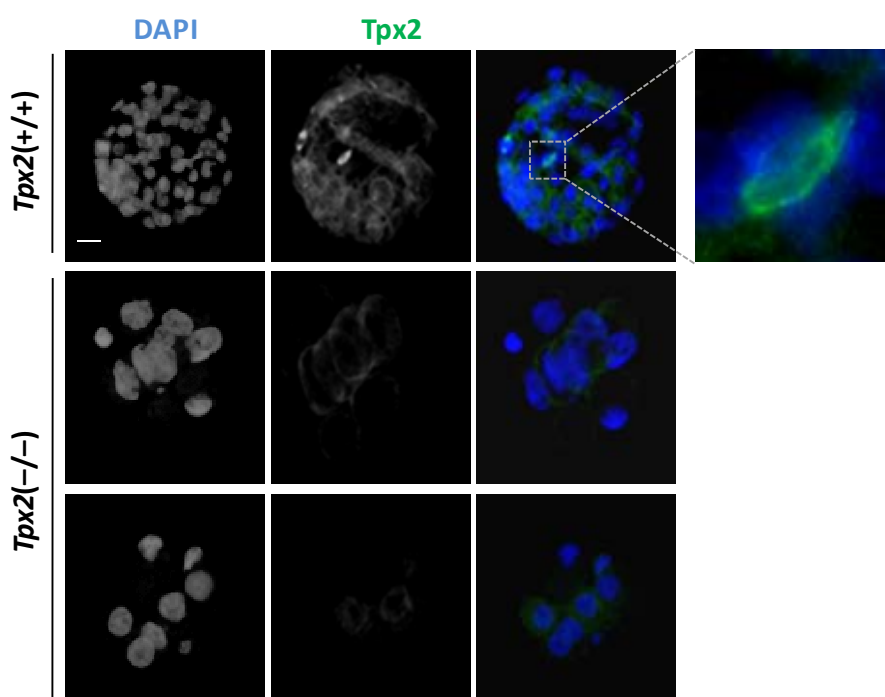


Figura 23: Anomalías en el huso mitótico de los embriones deficientes para *Tpx2*. (A) Inmunofluorescencia en embriones E1.5 mantenidos en cultivo durante 2 días adicionales. Mediante marcaje de DNA con DAPI, se calculó el número de células por mórula (***, $p < 0,0001$) así como el volumen de los núcleos (**, $p < 0,001$). (B) Inmunofluorescencia en embriones E(1.5) mantenidos en cultivo durante tres días adicionales. Los embriones *Tpx2*(+/+) alcanzan fase de blastocisto mientras que los *Tpx2*(-/-) permanecen en estado de mórula. DAPI, azul, marca el DNA. *Tpx2* está marcado en verde. Barras de escala 20 μ m.

3. Regulación del ciclo celular por Tpx2

3.1 Alteraciones en la progresión del ciclo celular y la segregación de cromosomas en ausencia de Tpx2

Con el objetivo de estudiar los mecanismos mediante los cuales Tpx2 es capaz de regular la formación del huso mitótico, comenzamos a trabajar con fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs; del inglés *mouse embryonic fibroblasts*) derivados de nuestro modelo condicional. Este sistema nos permitía eliminar Tpx2 *in vitro* mediante la expresión de la recombinasa Cre (Figura 18). Derivamos estas células de embriones extraídos en estadio E13.5, obtenidos a partir de cruces entre ratones de genotipo *Tpx2*(lox/lox), homocigóticos condicionales. Para eliminar Tpx2, infectamos los MEFs condicionales con adenovirus que expresaban la recombinasa Cre, de tal forma que pudimos obtener células deficientes para Tpx2. A partir de ahora nos referiremos a estas células como *Tpx2*(Δ/Δ). Como control negativo de la infección, utilizamos adenovirus que expresaban la recombinasa Flip, inocua para células de genotipo *Tpx2*(lox/lox).

Nuestro primer objetivo fue analizar la capacidad proliferativa de las células *Tpx2*(Δ/Δ) mediante un ensayo de curva de crecimiento. Las células *Tpx2*(Δ/Δ) presentaron una deficiencia significativa en su capacidad proliferativa en comparación con las células *Tpx2*(lox/lox) (**; $p < 0,01$) (Figura 24). ¿Cuál era la razón por la que el cultivo no podía progresar? Como primera aproximación, analizamos el contenido en DNA mediante citometría de flujo. Esto nos permitió tener una estimación del porcentaje de células que se encontraban en cada fase del ciclo. Para ello, indujimos la pérdida de expresión de Tpx2 en células arrestadas en G₀ y llevamos a cabo el protocolo detallado en Materiales y métodos y esquematizado en el panel B de la figura 24.

Las células control completaron un ciclo normal en 24-28 horas mientras que las células *Tpx2*(Δ/Δ) se acumularon como células con un contenido en DNA tetraploide 28 ó 32 horas después de la estimulación con suero (Figura 24 B). Detectamos, también, un aumento

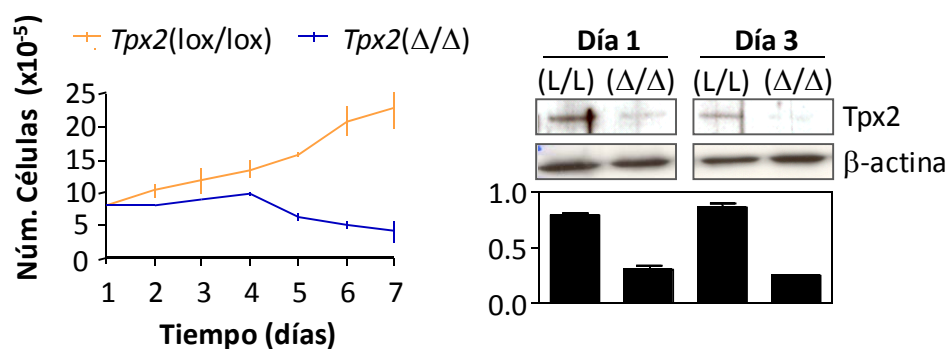
significativo en el porcentaje de células con un contenido en DNA mayor de 4N [13.0% en *Tpx2*(Δ/Δ) vs. 7.5% en *Tpx2*(lox/lox) 24 horas después de la inducción; $p=0,0061$]. Otro dato destacable fue el aumento significativo en células *Tpx2*(Δ/Δ) de la población sub-G0 (<2N) lo que sugería un aumento en la muerte celular (Figura 24B, paneles de la derecha).

Al analizar por inmunofluorescencia las poblaciones celulares 24 y 48 horas después de la entrada en ciclo, pudimos constatar un incremento significativo en células binucleadas así como en el porcentaje de células que presentaban micronúcleos (Figura 19). Este análisis nos permitió también encontrar un aumento significativo de células con núcleos aberrantes (polilobulados) (Figura 25). Estas tres características son reflejo de alteraciones severas en la segregación de cromosomas y sugieren la presencia de aberraciones en la ploidía de las células deficientes para *Tpx2*.

Para comprender hasta qué punto los niveles de expresión de *Tpx2* son limitantes para llevar a cabo una correcta división celular, analizamos la capacidad proliferativa de MEFs *Tpx2*(+/-). No encontramos diferencias significativas en la proliferación de células heterocigóticas al compararlas con células de genotipo salvaje. El análisis de estas células por citometría de flujo 48 y 72 horas después de la estimulación con suero, nos mostró que los MEFs *Tpx2*(+/-) presentaban un incremento en el porcentaje de células con un contenido de DNA >4N, si bien estas diferencias no resultaron significativas (Figura 26 A).

Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de alteraciones mitóticas así como en el porcentaje de células binucleadas o micronucleadas (Figura 26 B)

A.



B.

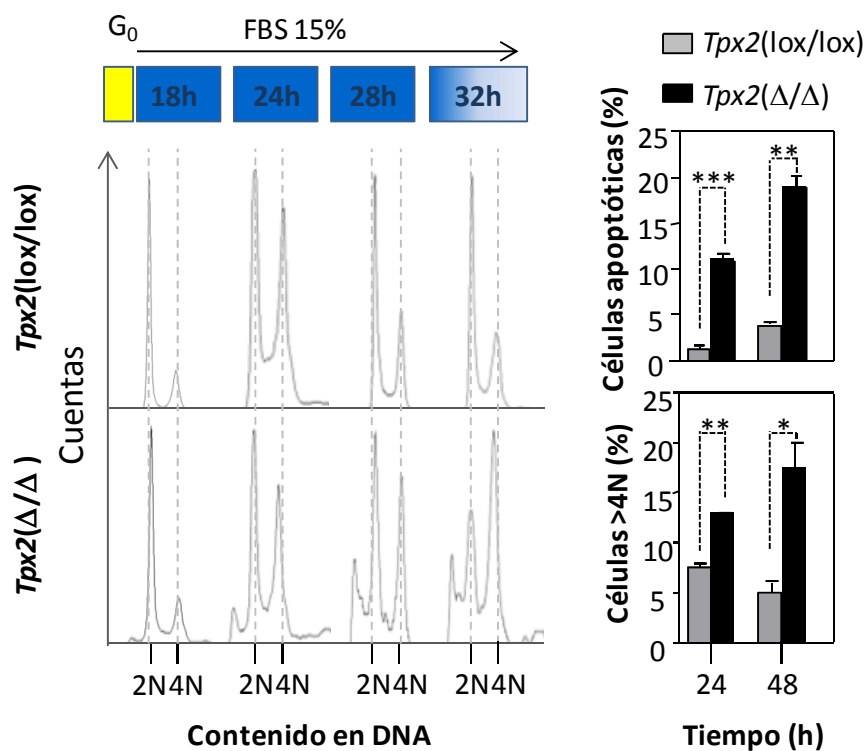


Figura 24: Defectos en la proliferación de células *Tpx2*(Δ/Δ). (A) Curva de crecimiento en fibroblastos primarios de ratón de genotipo *Tpx2*(lox/lox) y *Tpx2*(Δ/Δ). Los datos fueron normalizados frente al número de células sembradas en el día 1. El experimento se llevó a cabo por triplicado (**, p<0,01). La eliminación de Tpx2 fue confirmada por *western Blot*. (B) Análisis de entrada y salida de ciclo de células quiescentes estimuladas con alta concentración de suero. El análisis por citometría de flujo de células

marcadas con ioduro de propidio muestra cómo los fibroblastos *Tpx2*(Δ/Δ) se acumulan en poblaciones con contenido en DNA igual o mayor a 4N. El histograma superior muestra el porcentaje de células apoptóticas. El panel inferior representa el porcentaje de células con un contenido en DNA >4N para cada punto. (***, $p<0,0001$; ** $p<0,01$; $p<0,05$).

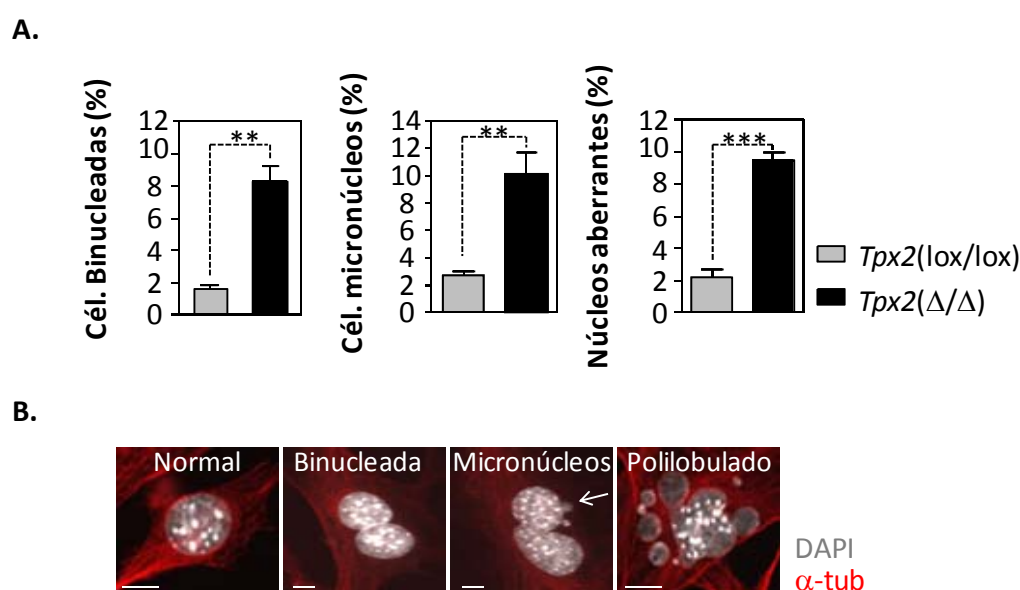
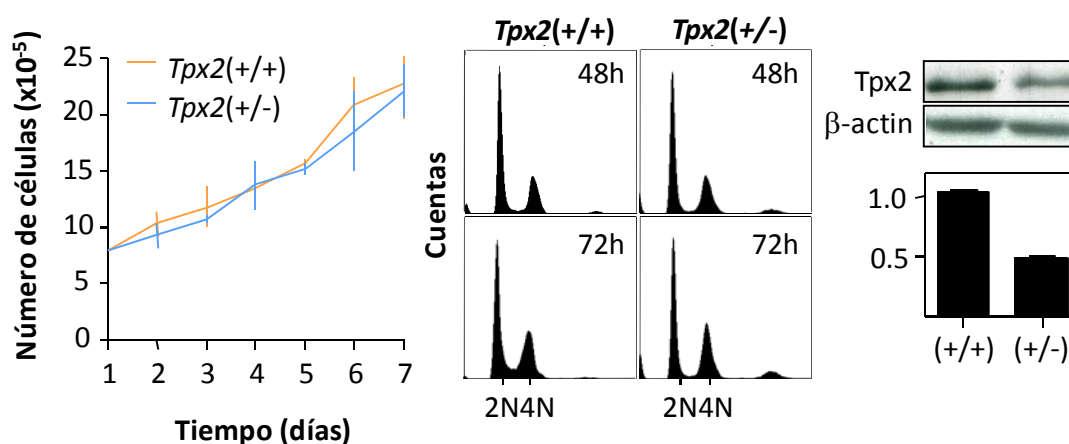


Figura 25: Aberraciones nucleares en fibroblastos deficientes en la expresión de Tpx2.(A) Cuantificación del porcentaje de células binucleadas, células con micronúcleos y células que presentaban núcleos de morfología aberrante (***, $p<0,0001$; ** $p<0,01$). Este análisis se llevó a cabo 72 horas después de la estimulación de entrada en ciclo. (B) Se muestran fotos representativas de células normales, binucleadas, con micronúcleos o con morfologías aberrantes. DAPI marca el DNA (blanco). En rojo, la α -tubulina decora los microtúbulos. Barras de escala, 10 μ m.

Como siguiente paso y ante los resultados obtenidos en los MEFs *Tpx2*(Δ/Δ), decidimos estudiar la entrada y salida de mitosis de estas células mediante un análisis individualizado por videomicroscopía. Para visualizar la cromatina, las células fueron transducidas con un vector de expresión de la histona H2B fusionada a la proteína fluorescente roja (mRFP; del inglés *mouse red fluorescent protein*) (HIV-H2BmRFP) (Kanda et al., 1998). Al comparar el porcentaje de células que entraron en mitosis, no encontramos diferencias significativas entre células de

genotipo salvaje ($26.2 \pm 7.0\%$) y las células deficientes en la expresión de Tpx2 ($22.4 \pm 6.8\%$) (Figura 27A).

A.



B.

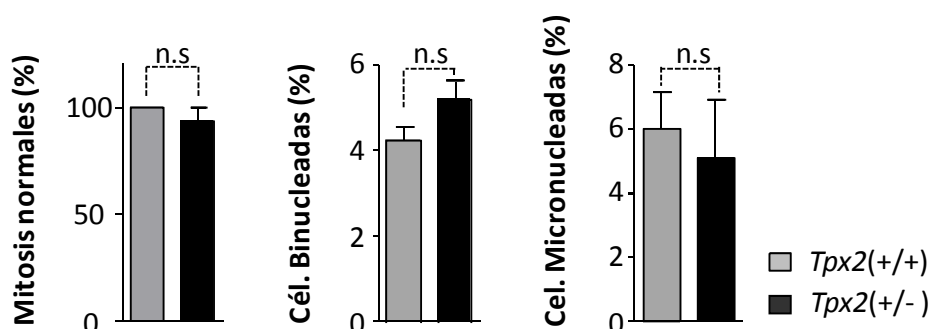
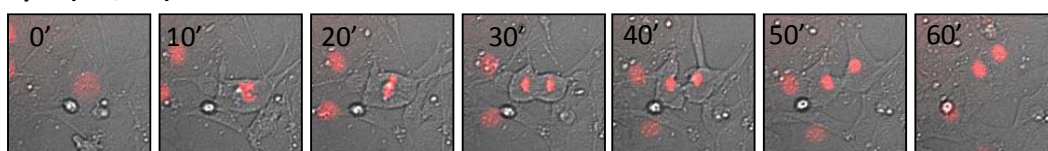
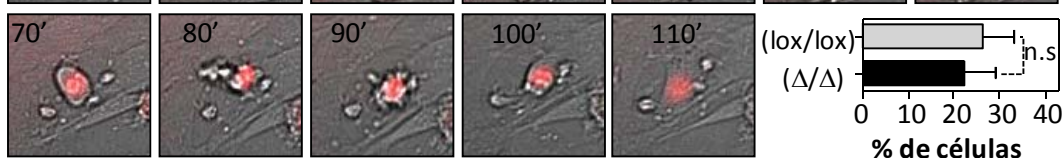
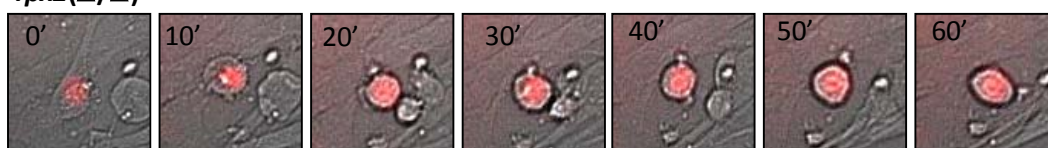


Figura 26: Proliferación normal en fibroblastos *Tpx2*(+/-). (A) Curva de crecimiento en células *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(+/-). Los datos fueron normalizados contra el número de células sembradas el día 1. El experimento se realizó por triplicado. No se encontraron diferencias significativas en la capacidad proliferativa de ambos grupos. Utilizamos citometría de flujo para analizar el perfil de ciclo de las células heterocigóticas para el alelo mutante. Los fibroblastos fueron teñidos con ioduro de propido. Los niveles de expresión de Tpx2 se determinaron por *western blot* (panel derecho). (B) Ausencia de aberraciones mitóticas en células *Tpx2*(+/-). Este análisis se llevó a cabo por inmunofluorescencia. Los histogramas representan el porcentaje de mitosis normales, células binucleadas y células con micronúcleos. En ninguno de los tres casos se encontraron diferencias significativas entre las células *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(+/-) (n.s, $p > 0.05$).

A.

Tpx2(lox/lox)*Tpx2*(Δ/Δ)

B.

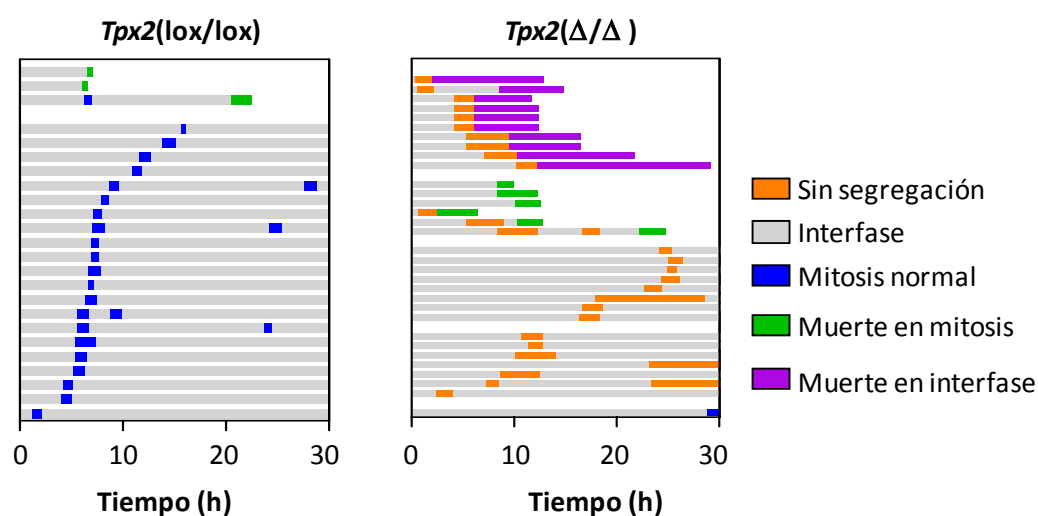


Figura 27: Mitosis prolongada y alteraciones en la segregación cromosómica tras la eliminación genética de *Tpx2*. (A) Imágenes tomadas de un ensayo de videomicroscopía en células de genotipo salvaje y células *knock-out* para *Tpx2*. En ambos casos las células expresan la histona H2B fusionada a la proteína fluorescente roja (mRFP). Las imágenes fueron tomadas cada 10 minutos. Las células *Tpx2*(lox/lox) eran capaces de llevar a cabo la mitosis en un tiempo medio de 70 minutos. Las *Tpx2*(Δ/Δ) necesitaron un tiempo medio de 120 minutos para salir de mitosis. El histograma superior muestra el porcentaje de células *Tpx2*(lox/lox) y *Tpx2*(Δ/Δ) que entraron en mitosis. No se encontraron diferencias significativas en este parámetro. (B) Destino de células analizadas de forma individual (n=34). Cada barra de los histogramas corresponde a una célula individual. El 97% de las células

deficientes en la expresión de Tpx2 llevaron a cabo mitosis aberrantes caracterizadas por la falta de segregación en dos células hijas.

Las células *Tpx2*(lox/lox) entraron en mitosis y completaron la segregación en dos células hijas en un tiempo medio de 73 minutos (73.1 ± 3.2 min; N=52) (Figura 27 y 28A). Sin embargo, las células *Tpx2*(Δ/Δ) permanecieron un tiempo medio de 122 minutos (121.5 ± 12.4 min; N=39) en mitosis para, finalmente, descondensar el DNA y salir como una única célula poliploide en el 96.9% de los casos (Figura 26 A). Es interesante destacar que un número significativo de células *Tpx2*(Δ/Δ) murieron en mitosis o durante la siguiente interfase (Figura 27 B), dato que se corresponde con el resultado obtenido en el análisis de citometría de flujo descrito anteriormente. El mismo análisis de células individuales por videomicroscopía nos permitió demostrar que las células heterocigóticas para Tpx2 llevaban a cabo la mitosis en un tiempo comparable al requerido por las células *Tpx2*(+/+). Así mismo, estas mitosis resultaron normales en el 97.5% de los casos (n=39) (Figura 28).

El punto de control mitótico, SAC, es el mecanismo principal que detiene la salida de mitosis hasta que todos los cromosomas están bi-orientados en la placa metafásica. La proteína Mad2 es esencial para monitorizar la correcta unión entre cinetocoros y microtúbulos durante la división celular. Ha sido ampliamente demostrado que la parada en mitosis provocada por drogas que alteran la dinámica y funcionalidad de los microtúbulos (taxol y nocodazol) puede revertirse al eliminar la expresión de Mad2 (Li and Benezra, 1996). Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si la parada en mitosis en células *Tpx2*(Δ/Δ) era consecuencia de la activación del SAC. Para ello, llevamos a cabo un experimento de videomicroscopía (siguiendo el mismo procedimiento detallado anteriormente) esta vez en presencia de un RNA interferente pequeño (siRNA; del inglés *small interference RNA*) contra Mad2. Gracias a la disminución en los niveles de la proteína Mad2 (Figura 29 A), conseguimos revertir el retraso en la salida de mitosis que presentaban las células *Tpx2*(Δ/Δ). De esta forma, el tiempo necesario para la salida de mitosis fue comparable al requerido por células *Tpx2*(lox/lox) [duración de mitosis en *Tpx2*(lox/lox)= 73.08 ± 3.162 min; *Tpx2*(lox/lox)+ RNAi Mad2= $72.90 \pm$

6.173 min; $Tpx2(\Delta/\Delta)$ = 121.5 ± 12.37 min vs. en $Tpx2(\Delta/\Delta)$ + RNAi Mad2 = 61.61 ± 3.63 min]. Estos resultados fueron reproducidos en presencia de nocodazol, droga desestabilizadora de microtúbulos (Figura 29A).

Estos datos sugieren que un mecanismo dependiente del SAC retrasa la salida de mitosis de las células deficientes en la expresión de Tpx2, probablemente como consecuencia de defectos en la correcta unión entre cromosomas y los microtúbulos del huso.

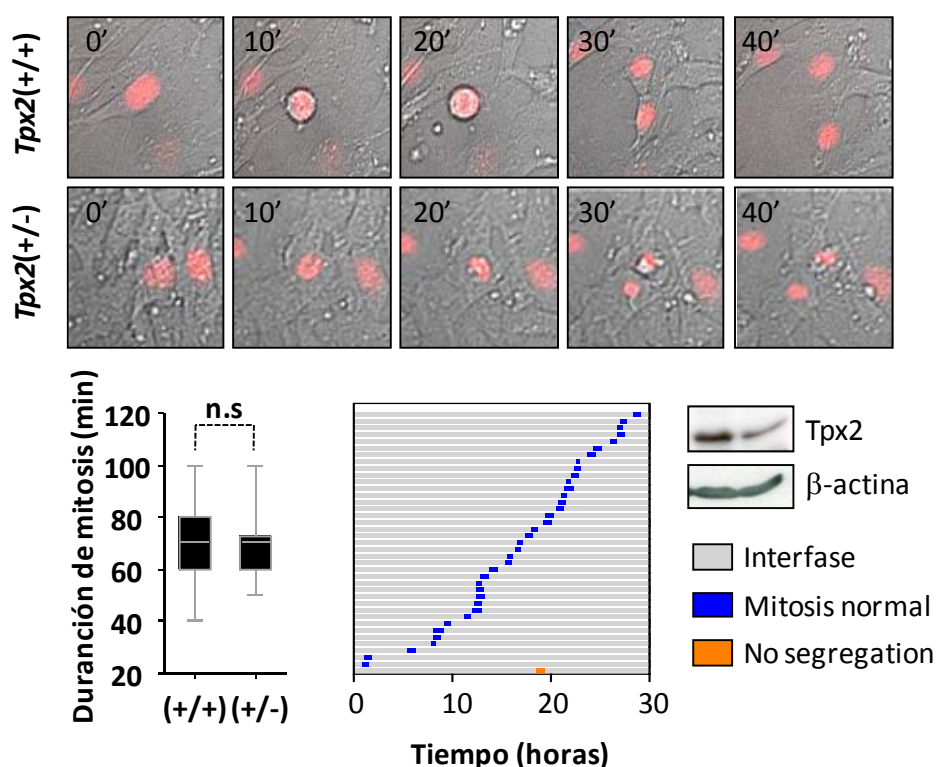
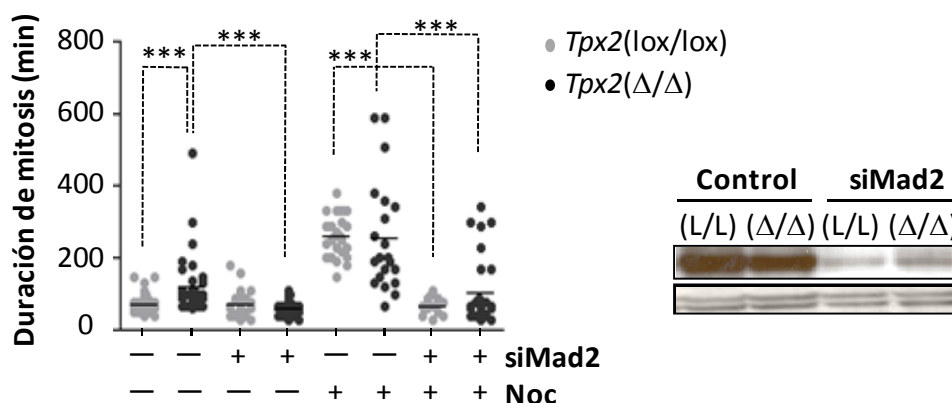


Figura 28: Las células heterocigóticas para el alelo mutante no presentan alteraciones en la progresión de mitosis. Análisis por videomicroscopía llevado en células $Tpx2(+/-)$ y $Tpx2(+/-)$ que expresan la histona H2B fusionada a proteína fluorescente roja. Las imágenes fueron tomadas cada 10 minutos. No encontramos diferencias significativas en la duración de mitosis de células $Tpx2(+/-)$ y $Tpx2(+/-)$. El histograma de la derecha muestra el destino de cada célula analizada durante un total de 30 horas. El 97,5% de las células ($n=39$) llevaron a cabo una mitosis normal, dando lugar a dos células hijas.

A.



B.

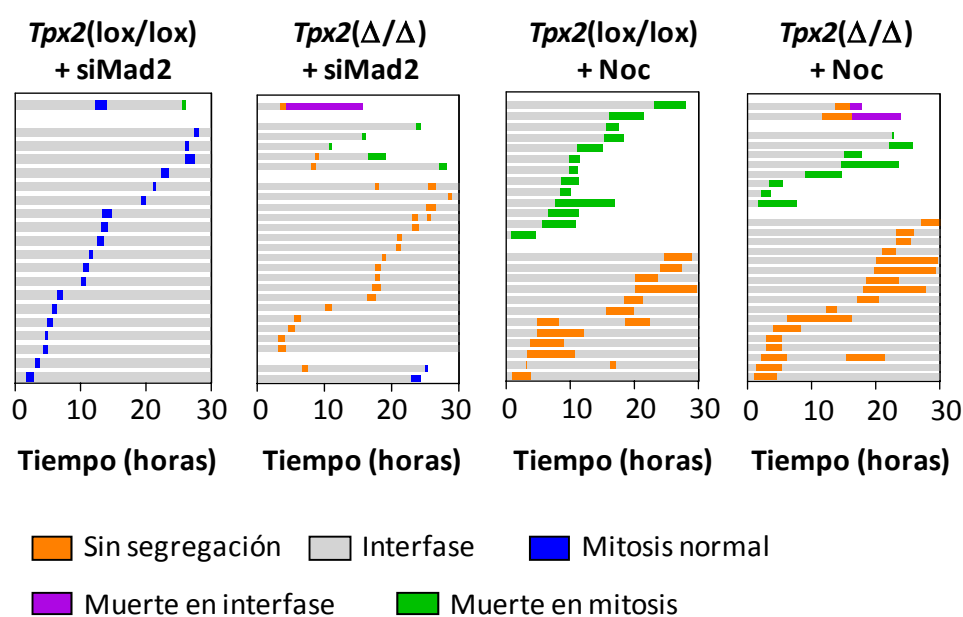


Figura 29: La pérdida de expresión de *Tpx2* provoca un retraso en la salida de mitosis que es dependiente del punto de control mitótico. **(A)** Cuantificación de la duración de mitosis obtenida a partir de ensayos de videomicroscopía. Se muestran los resultados de células tratadas con RNA interferente contra Mad2 en presencia y ausencia de nocodazol (Noc). El retraso en la salida de mitosis fue rescatado mediante la interferencia de Mad2 (se analizaron 22-25 células para cada condición; *** $p < 0,0001$). El panel derecho muestra los niveles de Mad2 en presencia del RNA (siRNA) interferente o del RNA control (*scramble*). **(B)** Destino de las células *Tpx2*(lox/lox) y *Tpx2*(Δ/Δ) tratadas con RNA interferente contra Mad2 en presencia y ausencia de nocodazol (Noc).

3.2 Tpx2 es esencial para polimerización de microtúbulos dependiente de cromatina

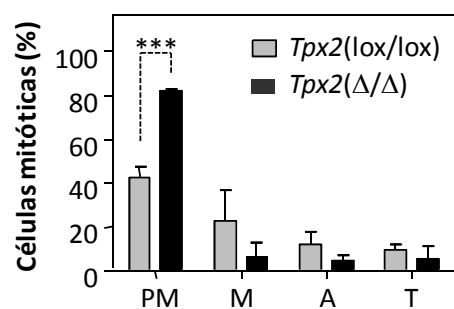
Nuestro siguiente objetivo fue entender qué estaba provocando ese retraso en la salida de mitosis, así como el origen de las alteraciones en la segregación cromosómica en las células *Tpx2*(Δ/Δ).

Ha sido demostrado, utilizando *Xenopus Laevis* o células humanas como modelo, que Tpx2 ejerce un papel crucial en el establecimiento de un huso mitótico bipolar (Garrett et al. 2002; Gruss et al. 2002). Por tanto, era esperable que esta función de Tpx2 apareciera también reflejada en los MEFs derivados de nuestro modelo condicional de ratón. Para confirmar esta hipótesis, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia, siendo el huso mitótico el objeto de nuestro interés.

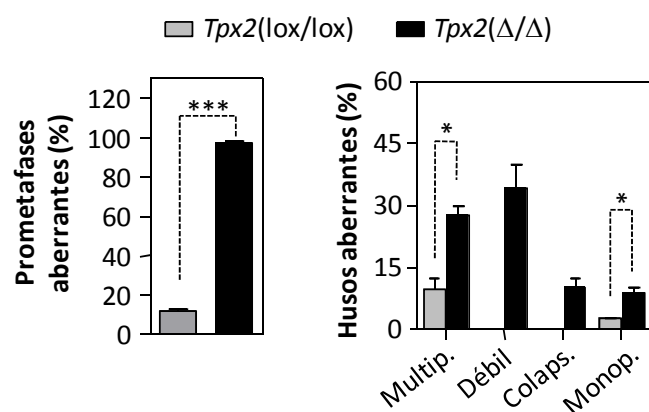
Siguiendo el protocolo de sincronización expuesto en la figura 24 para la sincronización de las células, analizamos la primera mitosis después de la eliminación de Tpx2. Los MEFs *Tpx2*(Δ/Δ) presentaron un aumento significativo en el porcentaje de células en prometafase en comparación con células de genotipo salvaje (Figura 30A). Este aumento en el porcentaje de prometafases [82% en *Tpx2*(Δ/Δ) vs 37% en *Tpx2*(lox/lox); ***, $p > 0,0001$] se acompañó de una disminución en el número de células en metafase, anafase o telofase (Figura 14B). En la mayoría de los casos estas prometafases resultaron ser aberrantes [98% en *Tpx2*(Δ/Δ) vs. 13% en *Tpx2*(lox/lox)] (Figura 30B).

Pudimos clasificar las alteraciones del huso mitótico más comunes en cuatro grupos: (i) husos colapsados, caracterizados por polos del huso pero con ausencia de microtúbulos del huso y una disminución en la distancia entre centrosomas; (ii) husos débiles, caracterizados por ausencia de fibras del huso pero ásteres robustos; (iii) husos monopolares o (iv) multipolares (Figura 30 B y C).

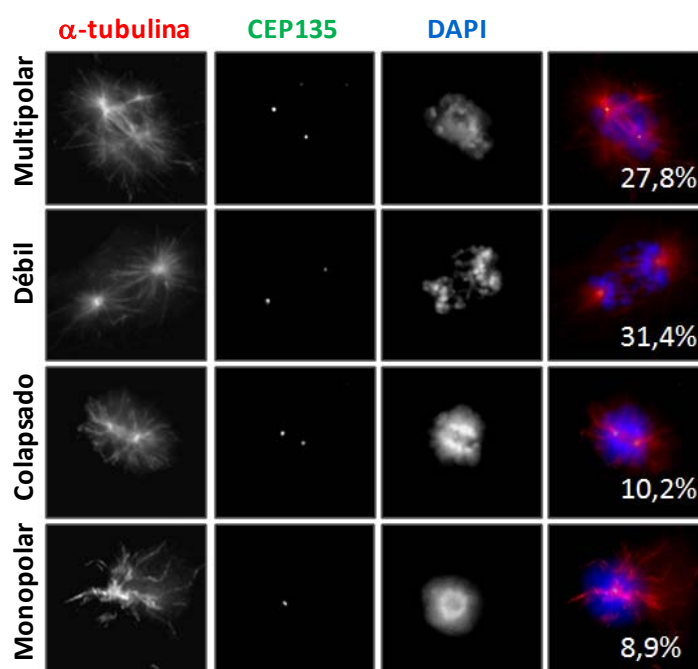
A.



B.



C.



D.

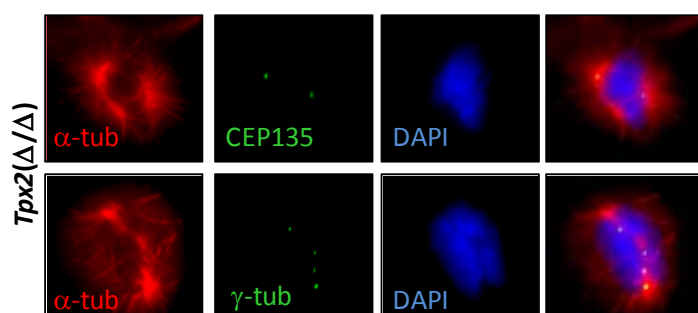


Figura 30: Husos mitóticos aberrantes en fibroblastos *Tpx2*(Δ/Δ). (A) Histograma de la distribución de las fases mitóticas analizadas por inmunofluorescencia. Nótese el incremento significativo en el porcentaje de prometafases (***, $p < 0,0001$). (B) Cuantificación de prometafases normales. El 89% de las prometafases analizadas presentaron husos aberrantes. El panel derecho muestra la distribución de las aberraciones mitóticas (***, $p < 0,0001$) (*, $p < 0,05$). (C) Imágenes representativas de las aberraciones en los husos mitóticos presentes en células *Tpx2*(Δ/Δ). El DNA está marcado con DAPI, α -tubulina decora los microtúbulos en rojo y Cep135, en verde, marca los centrosomas. (D) Se muestran imágenes representativas de células *Tpx2*(Δ/Δ). El marcaje con Cep135 (paneles superiores; verde) demuestra que las células con prometafases aberrantes poseen dos únicos centrosomas. Sin embargo, las células presentan rotura del material pericentriolar, como se observa gracias al marcaje de γ -tubulina (verde). El DNA está marcado con DAPI en azul y la α -tubulina, en rojo.

Teniendo en cuenta los problemas en la segregación del DNA en dos células hijas presentes en los MEFs *Tpx2*(Δ/Δ), se podría pensar que los husos multipolares tendrían su origen en la división de células poliploides que, por su condición, tendrían alterado también el ciclo de duplicación de los centrosomas. Para probar esta hipótesis, analizamos el estado de los polos adicionales en las células multipolares *Tpx2*(Δ/Δ). El marcaje con un anticuerpo anti-CEP135 nos permitió detectar los centriolos (Ohta et al., 2002; Kleylein-Sohn et al., 2007), mientras que la γ -tubulina nos permitió detectar el material pericentriolar que rodea los centrosomas. En todos los casos encontramos sólo dos focos positivos para CEP135 mientras que todos los polos presentes en las células aberrantes fueron positivos para el material pericentriolar (γ -tubulina). Esto nos indicaba que las células poseían un único par de centrosomas y que el resto de los polos organizadores de microtúbulos tendrían su origen en la fragmentación del material pericentriolar provocada seguramente por un desequilibrio entre las fuerzas de establecidas por los microtúbulos (Figura 30 D).

Cuantificamos, igualmente, la intensidad de α -tubulina en los husos mitóticos aberrantes para descartar que estos problemas se debieran a alteraciones en los niveles totales de la misma y no a alteraciones en la estructura de los microtúbulos. No encontramos diferencias significativas en los niveles de α -tubulina. Por lo tanto, hemos demostrado que los niveles totales de α -tubulina no están alterados en las células *Tpx2*(Δ/Δ), sino que es la formación de microtúbulos *per se* la que se ve afectada por la falta de *Tpx2* (Figura 31).

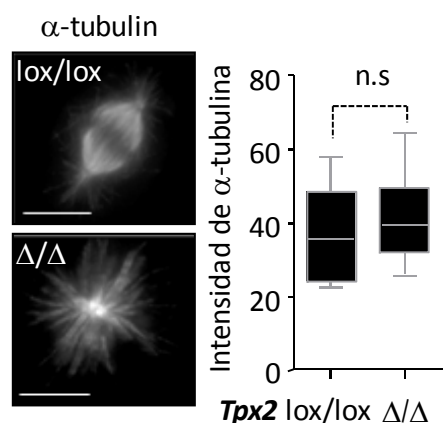


Figura 31: Los fibroblastos *Tpx2*(Δ/Δ) no muestran alteraciones en los niveles totales de α -tubulina. Se muestran imágenes representativas de un huso normal [*Tpx2*(lox/lox)] y un huso aberrante [*Tpx2*(Δ/Δ)]. El histograma de la derecha muestra la cuantificación de la intensidad de α -tubulina; no encontramos diferencias significativas entre los dos genotipos analizados. (n.s, $p=1$).

Como ya se mencionó en la introducción, una de las funciones más estudiadas de Tpx2 es su papel en la activación y localización de la quinasa Aurora A. Pero esta no es la única proteína cuya localización y función dependen de Tpx2, tanto Hklp2/Kif15 (Wittmann et al. 1998; Vanneste et al. 2009; Tanenbaum et al. 2009) como Eg5 (Ma et al. 2010; Gable et al., 2012) necesitan la presencia de Tpx2 para poder localizar en los microtúbulos. Por tanto, cabía esperar que la localización de estas tres proteínas, con funciones esenciales en el establecimiento del huso bipolar, se viera afectada por la pérdida de expresión de Tpx2. Nuestro siguiente objetivo fue constatar este hecho y para ello llevamos a cabo inmunofluorescencias en células *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(Δ/Δ) (Figura 32). La quinasa Aurora A, si bien no pierde totalmente su localización en los microtúbulos, sí experimenta una reducción significativa en las células *Tpx2*(Δ/Δ) ($p<0.0001$). Este fenotipo ya se había descrito para células humanas deficientes en la expresión de TPX2 (Kuffer et al., 2002). De acuerdo con otros datos publicados anteriormente, la localización de la quinesina Hklp2/Kif15 se vio dramáticamente alterada en células de ratón deficientes para la expresión de Tpx2 (Wittmann et al. 1998; Vanneste et al. 2009; Tanenbaum et al. 2009). Finalmente, no encontramos alteraciones significativas en la localización de Eg5 en los husos mitóticos aberrantes de las células *Tpx2*(Δ/Δ).

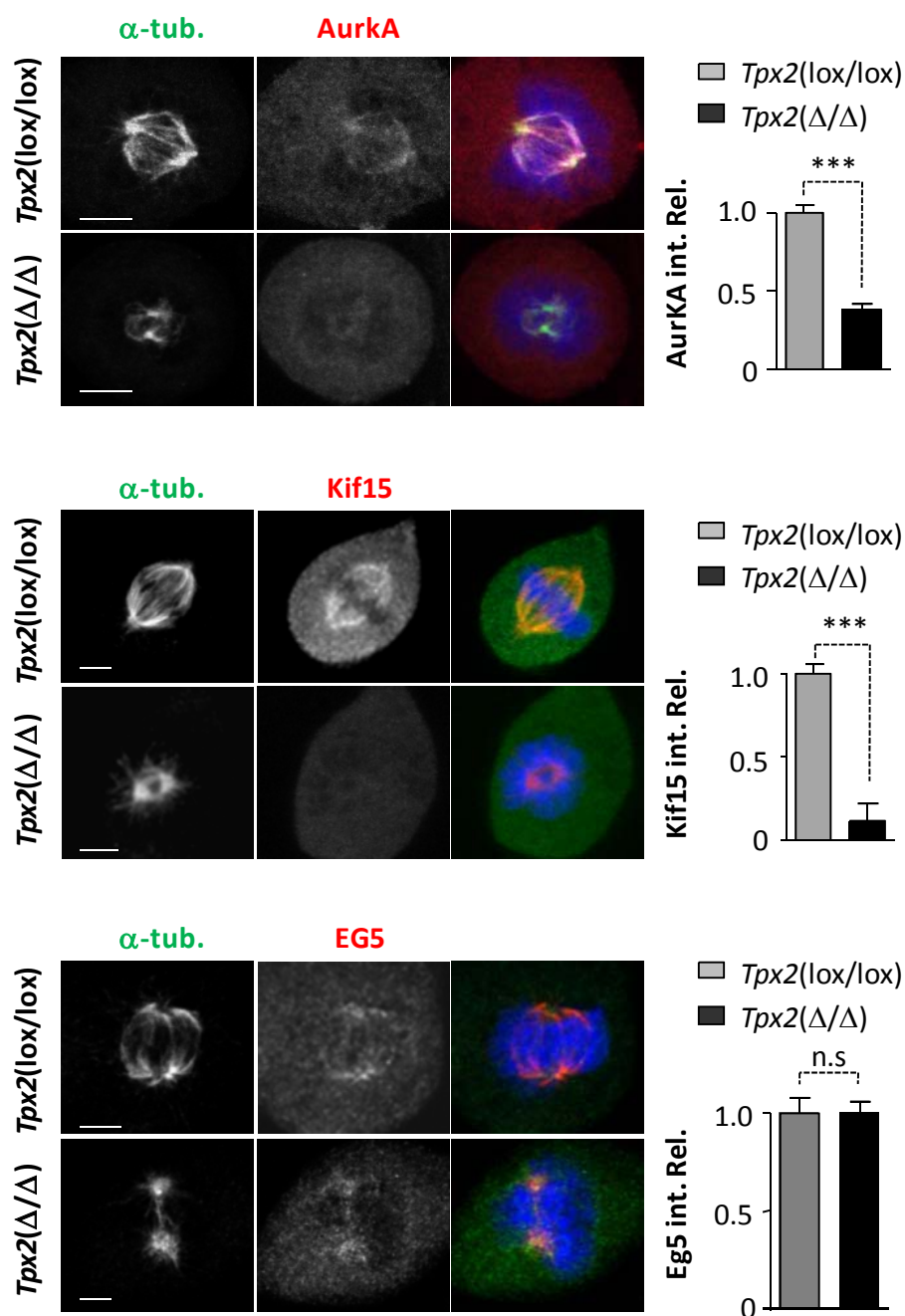


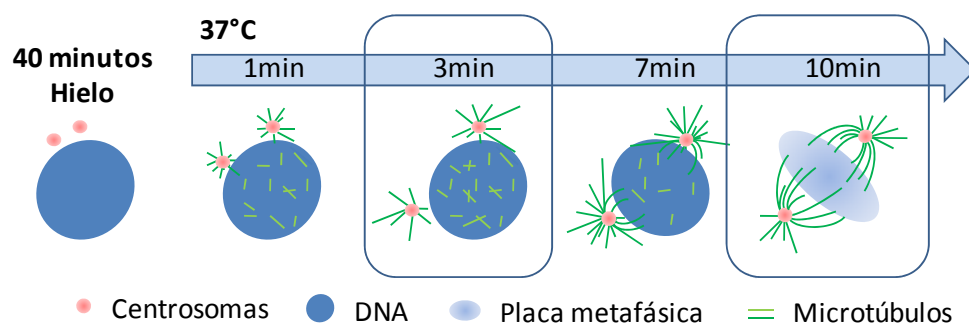
Figura 32: Localización de Aurora A, Hklp2/Kif15 y Eg5 en células *Tpx2(Δ/Δ)*. Se muestran imágenes representativas de la localización de los tres principales interactores de Tpx2. Aurora A y Kif15 se muestran en verde, Eg5 aparece marcado en rojo. Barras de escala, 5 μ m. Los histogramas muestran las cuantificaciones de las intensidades de las tres proteínas analizadas

3.3 Función esencial de Tpx2 en la formación y mantenimiento de la estabilidad de microtúbulos en mitosis

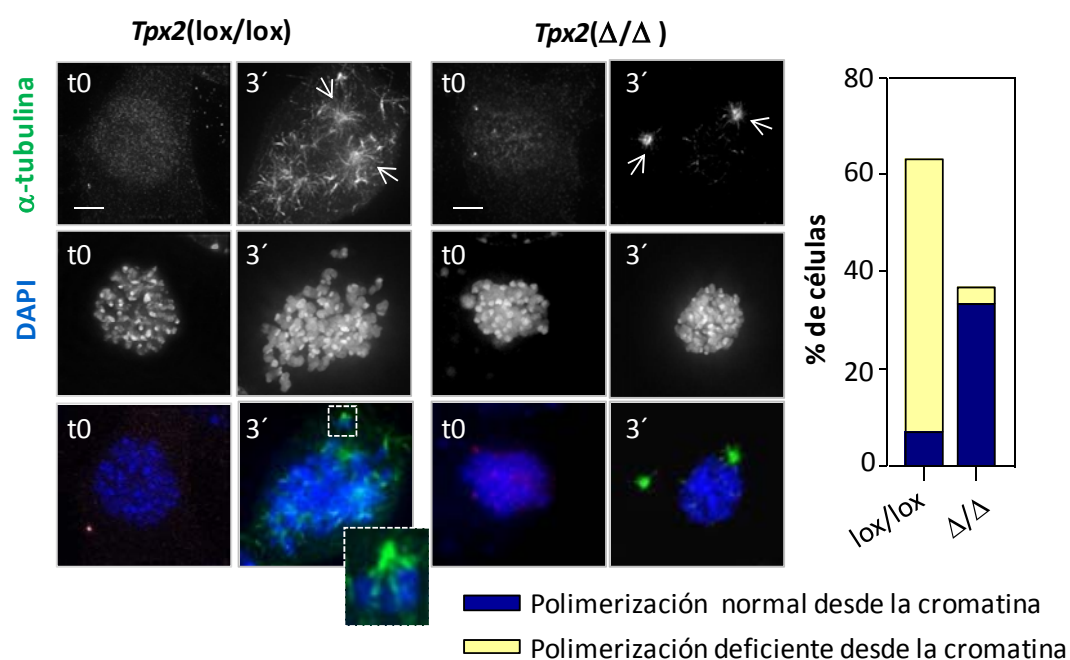
Nuestro siguiente objetivo fue comprender los mecanismos mediante los cuales Tpx2 era capaz de regular la formación de un huso mitótico bipolar y totalmente funcional.

Como hemos comentado en la introducción, ya había sido publicada la relevancia del gradiente de Ran-GTP en la formación de microtúbulos desde la cromatina (Carazo-Salas et al. 2001; Gruss et al. 2002; Tulu et al. 2006). Además, Alex W. Bird y Anthony Hyman han demostrado que es necesaria la formación del complejo Aurora A/Tpx2 para la polimerización de microtúbulos desde el DNA en células humanas (Bird and Hyman, 2008). Para constatar este hecho en nuestro sistema, analizamos la dinámica y estabilidad de los microtúbulos en presencia y en ausencia de Tpx2. Los ensayos de despolimerización y crecimiento de microtúbulos permiten distinguir entre la formación de las fibras desde el DNA y la polimerización dependiente de centrosomas (Figura 33). Para ello seguimos el protocolo detallado en el apartado de Materiales y métodos y esquematizado en la figura 18. Sometimos a las células a un tratamiento con medio frío y dispusimos las placas sobre una cama de hielo durante 40 minutos en presencia de nocodazol. Tras este tratamiento, pasamos las células sobre cubreobjetos a placas con medio a 37°C y fijamos las muestras 3 y 10 minutos después. Esto nos permitió analizar la polimerización dependiente de DNA (3 minutos a 37°C) y aquella procedente de los centrosoma (10 minutos a 37°C) (Figuras 33 A). Las células deficientes en la expresión de Tpx2 presentaron un defecto claro en la polimerización de α -tubulina desde el DNA (Figura 33A). Mientras que en el caso de las células *Tpx2*(lox/lox), la formación de fibras desde el DNA era evidente, dicha polimerización era prácticamente ausente en células *Tpx2*(Δ/Δ). Es importante destacar que la polimerización desde los centrosomas no se vio significativamente afectada (Figura 33). Tras 10 minutos de incubación a 37°C, en la mayoría de los casos las células con genotipo salvaje fueron capaces de formar husos mitóticos, si no bipolares, sí pseudobipolares. Sin embargo, el 59% de los husos *Tpx2*(Δ/Δ) resultaron colapsados y fueron multipolares en un 38% de los casos. Estos resultados reflejaban que la ausencia de Tpx2 provoca una polimerización defectuosa de microtúbulos desde la cromatina.

A.



B.



C.

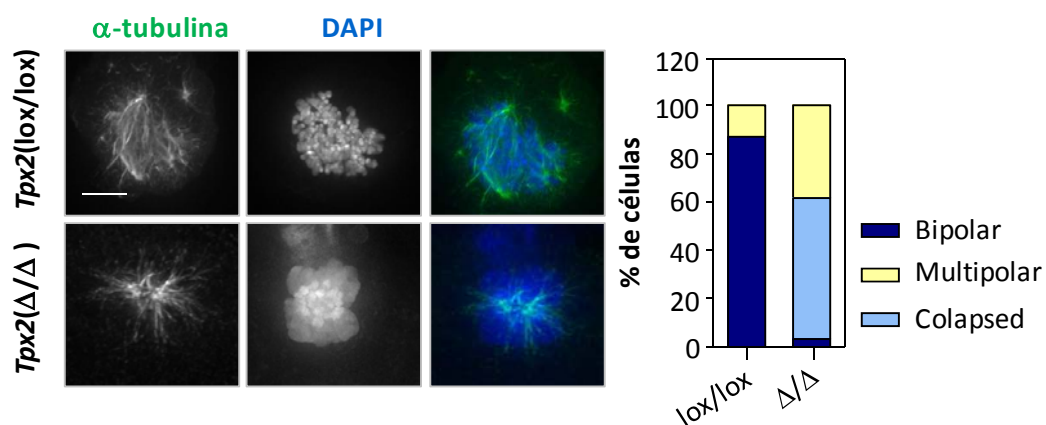


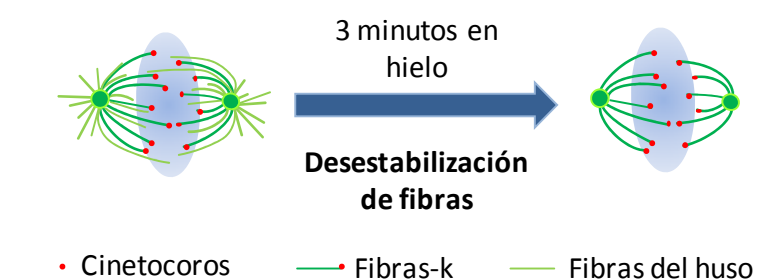
Figura 33: La polimerización de microtúbulos dependiente de cromatina es defectuosa en fibroblastos *Tpx2*(Δ/Δ). (A) Esquema representativo del ensayo de despolimerización y crecimiento de microtúbulos. Este ensayo permite diferenciar entre la polimerización proveniente del DNA y aquella que depende de centrosomas. (B) Polimerización defectuosa de microtúbulos desde los cromosomas en células *Tpx2*(Δ/Δ) tras un tratamiento con hielo de 40 minutos y una incubación a 37°C de 3 minutos. Los centrosomas sí presentaron polimerización de α -tubulina (flecha blanca). Las señales de α -tubulina (verde) en las proximidades de los cromosomas (DAPI, azul) se utilizaron como marcadores de polimerización de microtúbulos dependiente de cromatina. (C) Células incubadas a 37°C durante 10 minutos. Las células de genotipo salvaje son capaces de generar un huso mitótico bipolar (o pseudobipolar) mientras que las células *Tpx2*(Δ/Δ) presentan aberraciones estructurales y no son capaces de generar husos bipolares robustos. El histograma inferior muestra la cuantificación de estas aberraciones de los husos mitóticos. Barras de escala, 5 μ m.

Tpx2 localiza de forma específica en las fibras más estables del huso, las denominadas fibras-k, responsables de la interacción con los cromosomas. En células humanas la formación del complejo Aurora A-*Tpx2* es necesaria para el mantenimiento de la estabilidad de dichas fibras unidas a cinetocoros (Bird and Hyman, 2008). Pudimos confirmar esta localización en nuestro sistema mediante un ensayo de inmunofluorescencia (Figura 34 A).

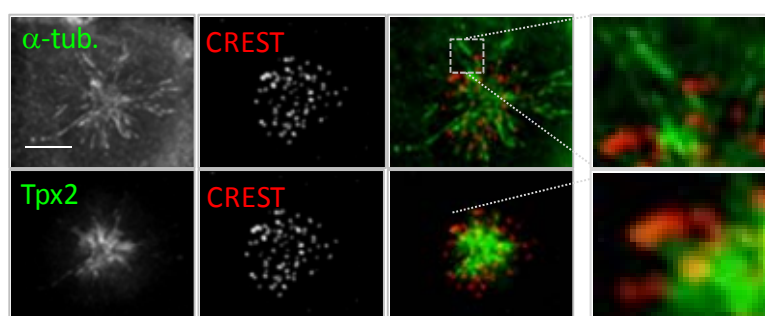
Para analizar el papel de *Tpx2* en la estabilización de fibras-k en nuestras células de ratón, realizamos un experimento que nos permitió forzar su desestabilización, de nuevo, tratando las células con medio frío y en presencia de hielo. Mediante tratamientos cortos con frío (3 minutos), las fibras menos estables se despolimerizan mientras que aquellas más estables, las fibras-k, no sufrirán alteraciones en células de genotipo salvaje (Figura 34 A). Llevamos a cabo este experimento en células deficientes para la expresión de *Tpx2* así como células *Tpx2*(+/+). Para una mejor visualización de las fibras utilizamos monastrol, un inhibidor de la proteína Eg-5 que da lugar a husos monopolares. Tal y como se muestra en el panel B de la figura 34, a causa del tratamiento con frío, las células salvajes perdieron las fibras menos estables mientras que las fibras-k se mantuvieron unidas a los cromosomas. Sin embargo, en las células *Tpx2*(Δ/Δ), ambos tipos de fibras se perdieron totalmente (Figura 34 B), reflejando diferencias significativas al establecer la comparación con células *Tpx2*(+/+) ($p=0.0034$) e indicando que *Tpx2* confiere estabilidad a las fibras-k, probablemente facilitando la captura de los cromosomas. Todos estos resultados obtenidos mediante el estudio de la dinámica y estabilidad de los microtúbulos,

revelaron la importancia de Tpx2 en los pasos iniciales de la formación del huso mitótico, así como su papel esencial en la estabilización de un huso bipolar, condición indispensable para una correcta segregación de los cromosomas.

A.



Tpx2(lox/lox)



B.

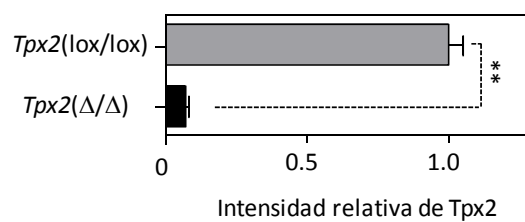
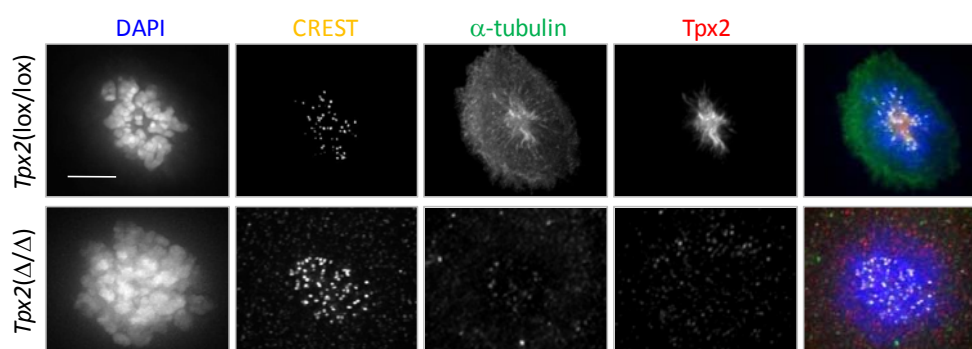


Figura 34: Mantenimiento de la estabilidad de las fibras-k por Tpx2. (A) Se muestra un esquema representativo del experimento de despolimerización con frío. Localización específica de Tpx2 en las fibras K. α -tubulina y Tpx2 se muestran en verde. La localización específica en las fibras K fue confirmada gracias al marcaje de los cinetocoros con CREST (rojo). (B) La estabilidad de las fibras-k se ve comprometida en ausencia de Tpx2. El DAPI marca el DNA, azul. CREST en blanco decora los cinetocoros. α -tubulina en verde y Tpx2 en rojo. Barras de escala, 5 μ m.

4. Implicación de Tpx2 en la formación y desarrollo de tumores

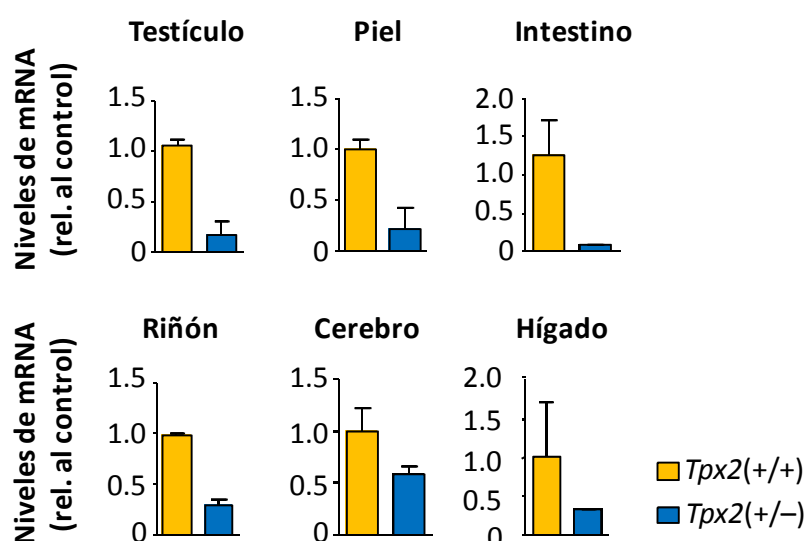
4.1 La disminución en los niveles de expresión de Tpx2 provoca inestabilidad cromosómica y aumento de la susceptibilidad al desarrollo tumores

Una vez comprendido el papel que desempeña Tpx2 en la progresión del ciclo celular mediante la regulación de la formación del huso, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la hipótesis de que las alteraciones en su expresión dan lugar al desarrollo de tumores. Como hemos explicado en la introducción, Tpx2 aparece amplificado y sobreexpresado en un amplio abanico de cánceres humanos (Tabla 1). Es también destacable el hecho de que Tpx2 es el gen que presenta una mayor correlación entre su sobreexpresión en tumores y los niveles de inestabilidad cromosómica que presentan dicho tumores (Carter et al. 2006). Sin olvidar que estos niveles de sobreexpresión se han asociado también con un pronóstico grave de la enfermedad.

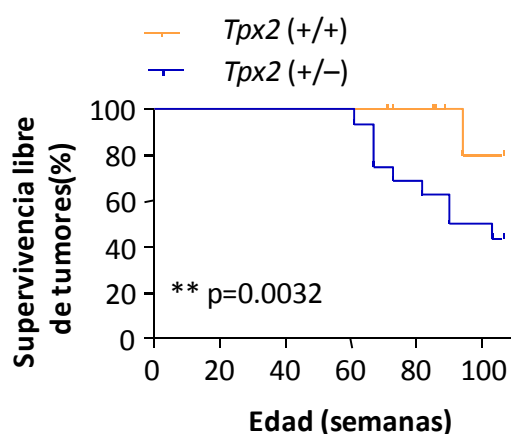
En los últimos años y para el caso de varios genes mitóticos, se ha podido establecer una asociación entre la sobreexpresión y la pérdida de expresión del mismo gen con el desarrollo de tumores humanos (Pérez de Castro et al. 2008). A partir de este hecho nos preguntamos si Tpx2 formaba parte de este grupo de genes. Establecimos dos cohortes de ratones *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(+/-) y llevamos a cabo un ensayo de envejecimiento con el objetivo de estudiar las patologías espontáneas de los animales heterocigóticos para Tpx2. Como paso previo, confirmamos la disminución en los niveles de expresión de Tpx2 en los ratones *Tpx2*(+/-) con respecto a los ratones de genotipo salvaje. Llevamos a cabo este análisis en tres tejidos

proliferativos (testículo, intestino y piel) y tres tejidos típicamente no proliferativos (riñón, cerebro e hígado) (Figura 35 A).

A.



B.



C.

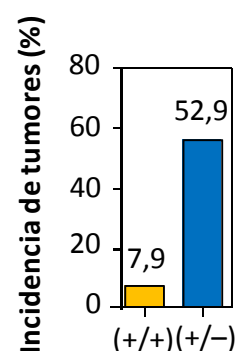


Figura 35: Los ratones heterocigotos para *Tpx2* son propensos al desarrollo de tumores espontáneos.

(A) Se tomaron tres muestras de tejidos proliferativos (testículo, piel e intestino) y tres tejidos no proliferativos (riñón, cerebro e hígado). Los niveles de RNA mensajeros se analizaron por transcripción inversa y posterior PCR cuantitativa. Los resultados fueron normalizados frente a los datos obtenidos en los animales control *Tpx2*(+/+). **(B)** Curva de supervivencia libre de tumores en dos cohortes de ratones *Tpx2*(+/+) (N=17) y *Tpx2*(+/-) (N=14). Los ratones heterocigóticos muestran una esperanza de vida significativamente menor que los animales de genotipo salvaje (**; $p < 0,005$). **(C)** El histograma muestra la incidencia de tumores en ratones *Tpx2*(+/+) (7,9%) y *Tpx2*(+/-) (52,9%).

Los animales *Tpx2*(+/-), nacieron sanos, sin ningún fenotipo aparente y resultaron totalmente fértiles, sin embargo presentaron una esperanza de vida significativamente menor que los ratones salvajes (Figura 35B). Los análisis histopatológicos de ambos grupos nos indicaron que el aumento de la mortalidad era debido al aumento en el desarrollo de tumores espontáneos en los ratones mutantes (incidencia del 52,9% en *Tpx2*(+/-) vs, 7.9% en ratones salvajes; $p < 0.001$ (Figura 35C). Los linfomas fueron los tumores que aparecieron con mayor frecuencia [(35.3% de los tumores *Tpx2*(+/-) vs. 7.1% en ratones *Tpx2*(+/+)]. Estos linfomas no eran únicamente más abundantes sino que se caracterizaron por una mayor agresividad. En el panel A de la figura 36 mostramos un ejemplo en el que el linfoma fue capaz de invadir órganos como el corazón o el cerebro, entre otros tejidos, situación que no encontramos nunca en el grupo de animales control.

Incidencia de patologías (%)			
	<i>Tpx2</i> +/+ n=14	+/- n=17	Latencia (meses)
Linfoma	7.1	35.3	20
Adenoma de pulmón	0	29.5	20
Hiperplasia en la pituitaria	0	11.8	22.5
Adenoma en el intestino	0	5.9	24
Carcinoma en el estómago (glandular)	0	5.9	22
Hepatocarcinoma	0	5.9	26
Neoplasia intraepitelial prostática	0	5.9	22.5

Tabla 5: Patologías espontáneas en ratones *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(+/-). Los ratones heterocigóticos son propensos, entre otras patologías, al desarrollo espontáneo de linfomas y adenocarcinomas.

Los ratones mutantes para *Tpx2* desarrollaron también con mayor frecuencia tumores de pulmón (adenomas alveolares y adenocarcinomas; 29.4%) (Tabla 5 y Figura 35 B), así como

otras patologías que no fueron encontradas en el grupo de *Tpx2*(+/+): adenocarcinomas en páncreas o hiperplasia en la parte intermedia de la pituitaria (Tabla 5, Figura 36 C).

Estos resultados demostraron que los ratones *Tpx2*(+/-) presentan propensión al desarrollo de tumores de larga latencia que comprometen su esperanza de vida.

¿Presentan estos tumores niveles aumentados de inestabilidad? Ésta fue la pregunta que nos planteamos teniendo en cuenta el trabajo publicado por Carter y colaboradores en 2006. Para analizar esta posibilidad, comparamos el cariotipo de células derivadas de los bazos tumorales de ratones *Tpx2*(+/-) con el de células procedentes de los ratones control *Tpx2*(+/+). Tras 72 horas en cultivo y en presencia de compuestos mitogénicos (lipopolisacárido), llevamos a cabo un esparcido cromosómico, teñimos las muestras con DAPI y procedimos al conteo de los cromosomas. Este ensayo nos permitió demostrar que los tumores *Tpx2*(+/-) presentaban un alto porcentaje de células aneuploides. Sin embargo, los bazos sanos de individuos de la misma edad (90 semanas) presentaron un 100% de células euploides (con cariotipos entre 39 y 40) (Figura 37 A).

Para estudiar si el aumento en las aneuploidías era consecuencia del desarrollo del tumor o si, por el contrario, este aumento tenía una relación causal con la tumorigénesis, comparamos el cariotipo de células derivadas del bazo de ratones jóvenes (16 semanas) y de ratones sanos de mayor edad (90 semanas). Los ratones heterocigóticos de 16 semanas presentaron un 18.3% de células con cariotipos que variaron entre 34 y 83 cromosomas por metafase. En el caso de los ratones control, un 100% de células presentaron cariotipos normales (Figura 37 B). El porcentaje de células aneuploides se incrementó en un 27% en los ratones *Tpx2*(+/-) de 90 semanas. De nuevo, los ratones de genotipo salvaje mantuvieron cariotipos entre 39 y 41 cromosomas por célula. Estos datos nos han permitido demostrar el papel crítico que *Tpx2* desempeña en el mantenimiento de la ploidía de células de mamífero *in vivo*.

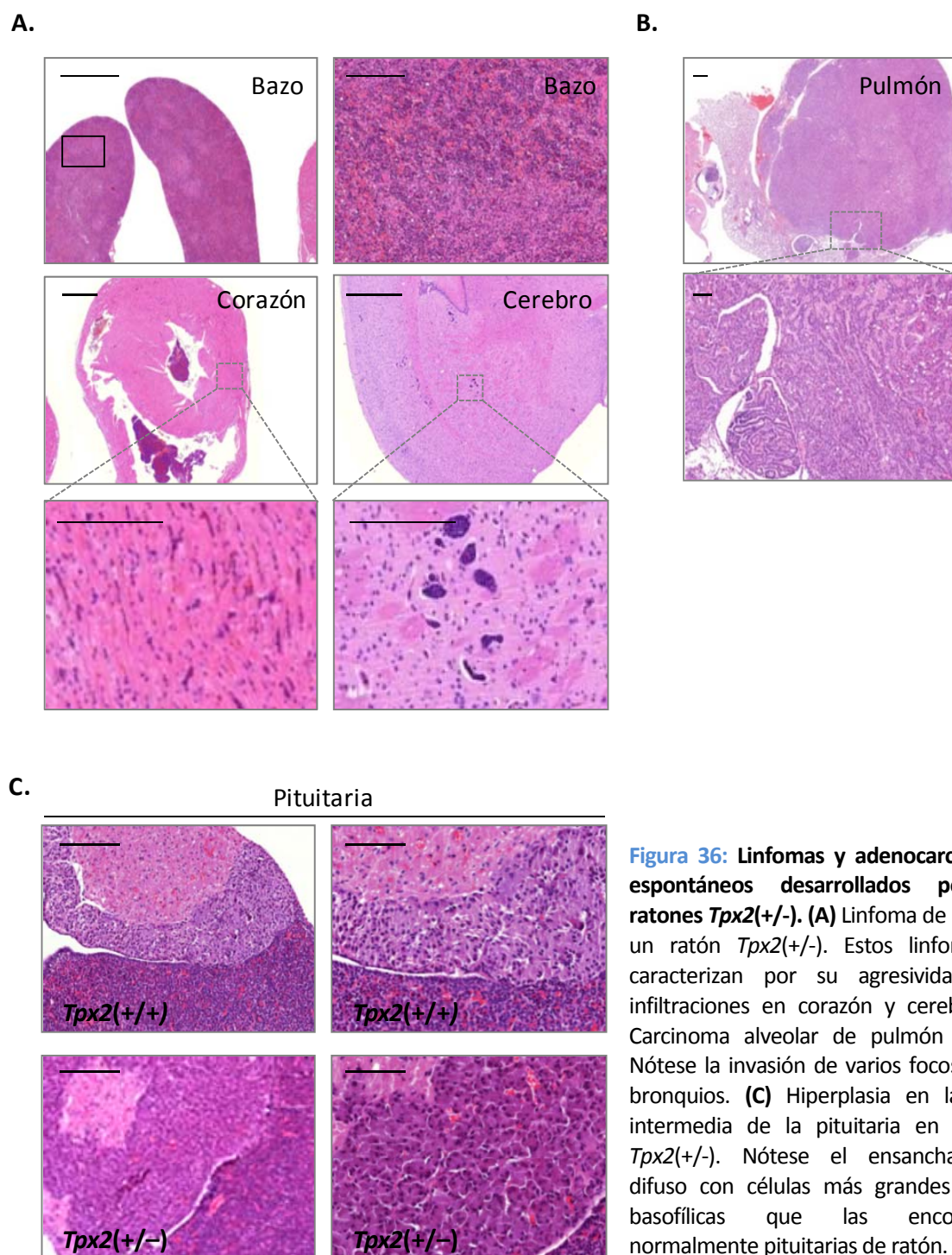
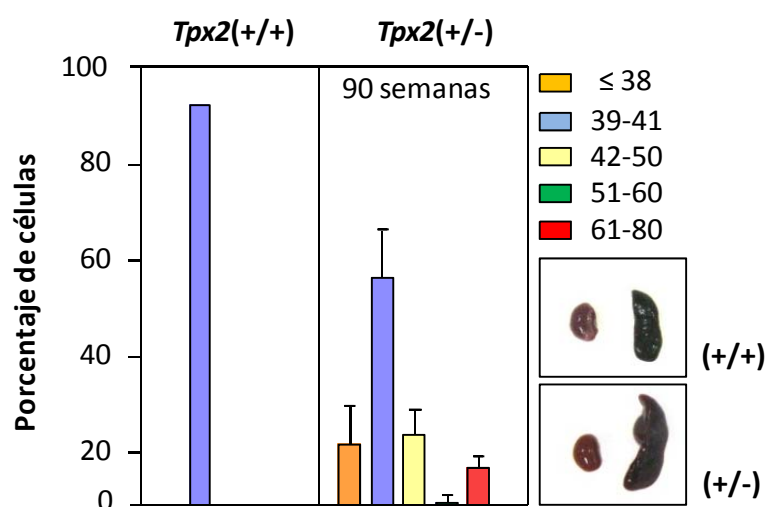


Figura 36: Linfomas y adenocarcinomas espontáneos desarrollados por los ratones *Tpx2*(+/-). (A) Linfoma de bazo en un ratón *Tpx2*(+/-). Estos linfomas se caracterizan por su agresividad, con infiltraciones en corazón y cerebro. (B) Carcinoma alveolar de pulmón tipo II. Nótese la invasión de varios focos en los bronquios. (C) Hiperplasia en la parte intermedia de la pituitaria en ratones *Tpx2*(+/-). Nótese el ensanchamiento difuso con células más grandes y más basofílicas que las encontradas normalmente pituitarias de ratón.

A.



B.

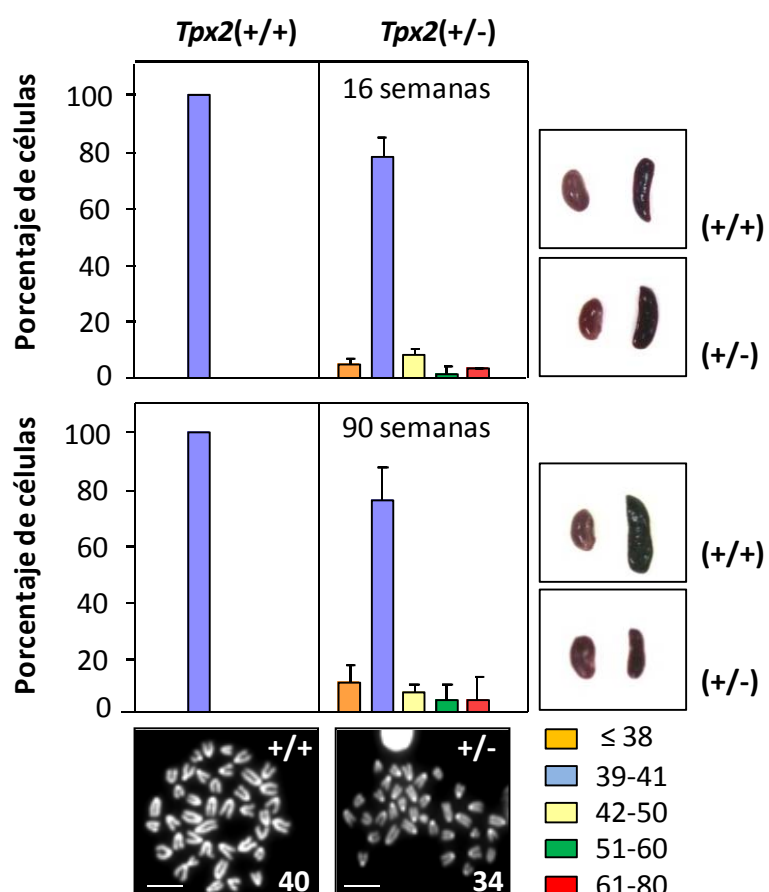


Figura 37: Los ratones heterocigotos para *Tpx2* acumulan aneuploidías durante su desarrollo dando lugar, finalmente, al desarrollo de linfomas. (A) Cariotipado de células procedentes de bazo tumoral

y sanos de 90 semanas. Las células procedentes de tumores de ratones *Tpx2*(+/-) presentan un elevado porcentaje de células aneuploides. Como control se utilizaron células derivadas de bazo de ratones *Tpx2*(+/+) de la misma edad. **(B)** Los histogramas muestran la ploidía de células derivadas de tejidos *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(+/-). El porcentaje de células aneuploide aumenta entre las 16 (panel superior) y las 90 semanas (panel inferior) de edad. Se muestran imágenes representativas de los cariotipos analizados. Los cromosomas aparecen marcados con DAPI. A la derecha de los histogramas se incluyen imágenes representativas de los bazo analizados. Se muestra el riñón como referencia del tamaño del bazo.

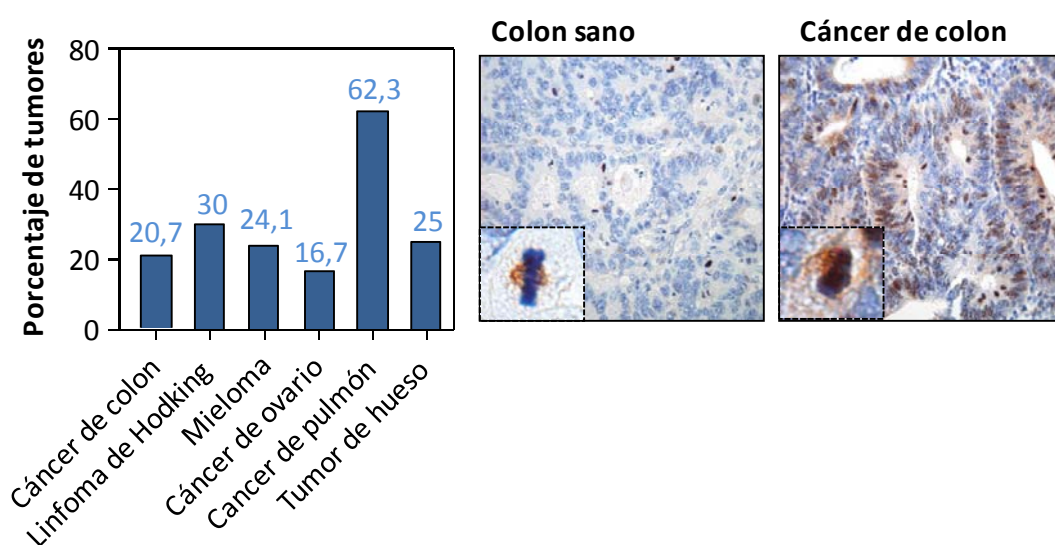
4.2 *Tpx2* aparece sobreexpresado en varios tipos de cáncer humano

Como complemento a los estudios ya realizados, nos planteamos como objetivo analizar los niveles de expresión de *Tpx2* en varios cánceres humanos cuyo análisis no había sido publicado con anterioridad. La colaboración con varios grupos pertenecientes a distintas instituciones (Hospital La Paz de Madrid, MD Anderson Cancer Center de Madrid y el Hospital de Santa Creu y Sant Pau en Barcelona) nos permitió demostrar que los niveles de expresión de *Tpx2* aparecen incrementados en un alto porcentaje de cánceres de colon (20.7%; n=99), linfoma de Hodking (30%;n=218), mielomas (24.1%; n=81) y en cáncer de ovario (17,6%; n=60)(Figura 38A). Para este ensayo, tomamos muestras de pulmón y cáncer de hueso como control positivo del estudio, ya que la sobreexpresión de *Tpx2* en estos tumores ya había sido descrita (Zhang et al. 2008; Smith et al. 2006).

Tomando como modelo de estudio las muestras de cáncer de colon y mediante el marcaje de los cromosomas 20 y 7 por hibridación fluorescente *in situ* (FISH; del inglés, *fluorescence in situ hybriditation*), hemos podido demostrar que un porcentaje significativo de tumores de colon presenta inestabilidad cromosómica (Figura 38 B). Conocer los datos clínicos de parte de los pacientes de los que poseíamos muestras de tumor, nos permitió analizar la correlación entre los niveles de expresión de *Tpx2* y la esperanza de vida de los enfermos. En cuanto a los linfomas de tipo Hodking, poseíamos los datos clínicos de 156 pacientes (de un total de 218) y encontramos una correlación positiva entre el nivel de sobreexpresión de *Tpx2* y la menor esperanza de vida de los pacientes ($p=0,004$) (Figura 39 A). Las diferencias en la esperanza de vida se hacen más patentes en los casos en los que la enfermedad está más

avanzada ($p < 0,001$) (Figura 38 B). Este dato apoya los resultados publicados en 2006 (Carter et al., 2006) en relación al pronóstico grave de los tumores que presentan niveles elevados de Tpx2. Para los casos de cáncer de ovario y mielomas, no encontramos correlación entre la sobreexpresión de Tpx2 y el pronóstico de los tumores.

A.



B.

FISH es muestras de ovario (Cr. 20 y Cr. 7)

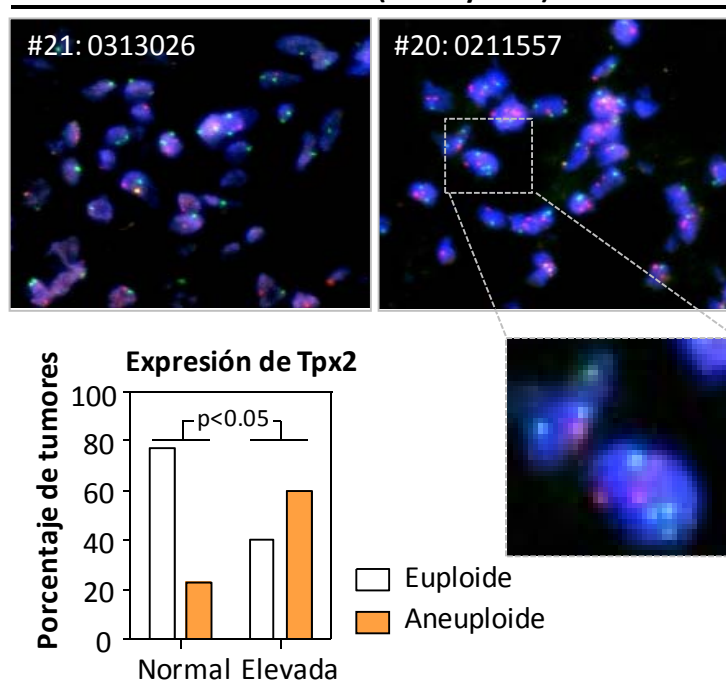


Figura 38: Tpx2 aparece sobreexpresado en varios cánceres humanos y está asociado con la presencia de inestabilidad cromosómica en dichos tumores. (A) Porcentaje de tumores que presentan sobreexpresión de Tpx2. Este análisis se llevó a cabo por inmunohistoquímica. Las cuantificaciones se realizaron de forma automática con un *software* de escaneo (Olympus). Como control positivo se utilizaron muestras de tumores pulmón y hueso. A la derecha se muestran dos imágenes representativas de un colon sano en el que se aprecia una célula mitótica con Tpx2 decorando los microtúbulos. La foto de la izquierda corresponde a una muestra de cáncer de colon que presenta sobreexpresión de Tpx2. Nótese la ampliación de una figura mitótica aberrante. (B) Análisis de aneuploidías en muestras de cáncer de ovario por hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Se muestran las imágenes de dos de los tumores analizados (0313026 y 0211511). Se utilizaron sondas contra el cromosoma 7 (verde) y el cromosoma 20 (rojo). El histograma muestra cómo un elevado porcentaje de tumores que sobreexpresan Tpx2, presentan aneuploidías (23% de tejidos normales vs 60% de tejidos tumorales; $p < 0,05$).

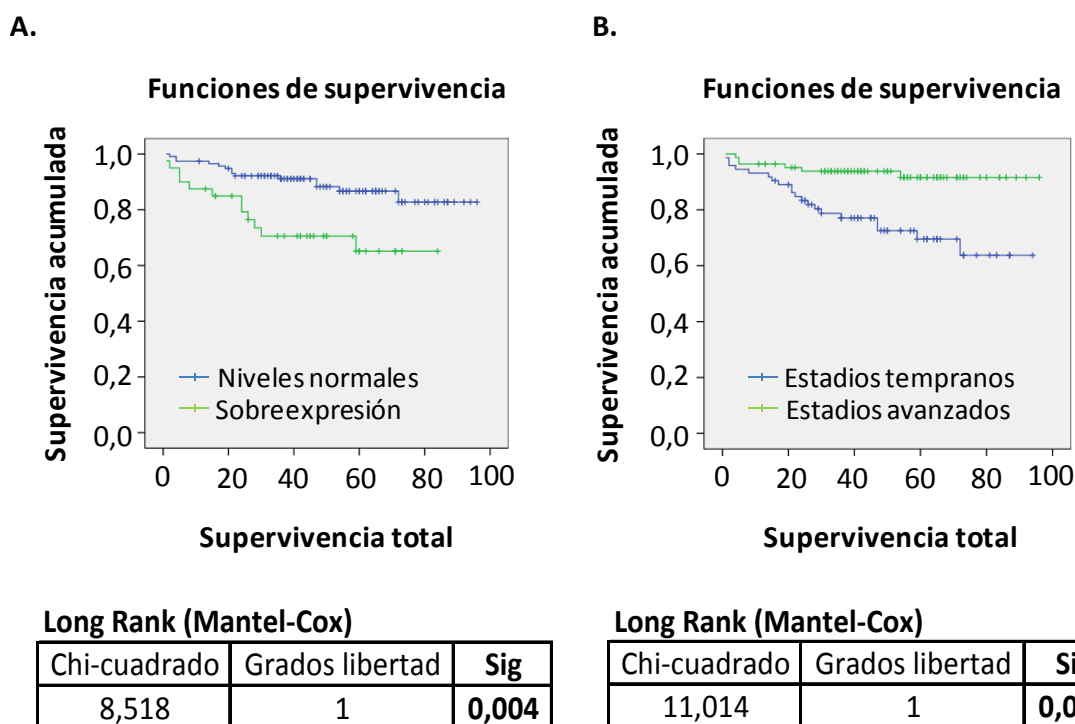


Figura 39: Los pacientes con linfomas de Hodking que sobreexpresan Tpx2 tienen peor pronóstico. Se estudió el historial médico de un total de 156 pacientes. (A) Se muestra la curva de supervivencia de dichos pacientes. Existen diferencias significativas en las distribuciones de supervivencia (**; $p < 0,005$). Se muestra la prueba de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de sobreexpresión frente a niveles normales de Tpx2. (B) Las diferencias se hacen más significativas en estadios avanzados de la enfermedad. Se muestra la prueba de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de sobreexpresión frente a niveles normales de Tpx2.

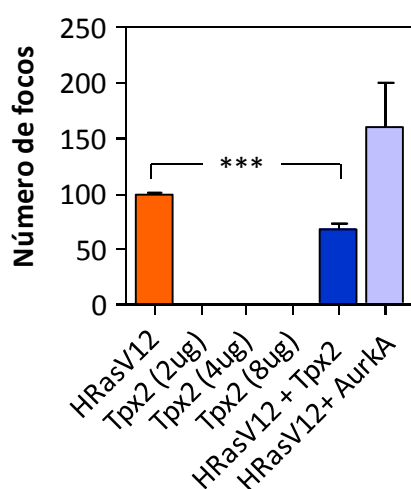
4.3 La sobreexpresión de Tpx2 induce inestabilidad cromosómica *in vitro*.

Hasta ahora, utilizando como modelo los ratones heterocigóticos para el alelo mutante, hemos demostrado que los niveles bajos de expresión de Tpx2 dan lugar a aneuploidías tanto *in vivo* como *in vitro* (Figuras 25 y 37). De igual modo, hemos demostrado que la sobreexpresión de Tpx2 *in vivo* está asociada a un aumento en la inestabilidad cromosómica. Sin embargo, sigue quedando pendiente el demostrar la posible relación causal entre la sobreexpresión de Tpx2 y la inestabilidad cromosómica encontrada en células transformadas. Para corroborar esta hipótesis, llevamos a cabo un ensayo de focos con fibroblastos de ratón inmortalizados que además presentan una mutación en el gen de Cdk4 (R24C) que le hace insensible a la inhibición por proteínas de la familia INK4.

Mediante este ensayo pudimos demostrar que distintos niveles de sobreexpresión de Tpx2 no es capaz de provocar la transformación oncogénica de las células (Figura 40 A). La sobreexpresión del oncogén Ras en células NIH3T3 sí que induce la transformación celular como consecuencia de la pérdida de inhibición por contacto de las células que, de esta forma, son capaces de crecer en tres dimensiones formando nódulos o focos de células (Jacobsen et al., 2002) (Figura 40 A; HrasV12=88 focos). Por otro lado, se ha demostrado previamente que la sobre-expresión de Aurora-A, uno de los principales efectores de Tpx2, colabora con el oncogén Ras en la transformación celular (Tatsuka et al., 2005). Basándonos en este hecho, decidimos co-expresar el oncogén HRasV12 y la proteína Tpx2 para analizar la posible colaboración de Tpx2 en el fenotipo maligno inducido por HRasV12. En este caso los datos fueron normalizados frente al número de focos de las muestras que sobre-expresaban HRasV12, que fue considerado como 100%. Tal y como esperábamos, Aurora A coopera con el oncogén Ras (159% con respecto a HRasV12) en la transformación celular, mientras que la sobreexpresión de Tpx2 inhibe la formación de focos provocada por la sobreexpresión del oncogén HRasV12 (67% respecto a la sobre-expresión de HRasV12; *** $p < 0,001$) (Figura 40 B). Esta inhibición parece dependiente de la quinasa Aurora, puesto que la sobreexpresión de un mutante de Tpx2 incapaz de unirse a la quinasa, no inhibe las propiedades de transformación del oncogén HRasV12 (133% respecto a la sobreexpresión de HRasV12) (Figura 40 B). Por último, hemos

demostrado que la disminución de la expresión de Tpx2 mediante shRNA provoca también una disminución en la formación de focos, inducida por HRasV12, al mismo nivel que lo hace la inhibición de la quinasa Aurora A (HRasV12+shTpx2=63%; HRasV12+shAurkA=76% con respecto al número de focos en células que sobre-expresan HRasV12) (Figura 40 B).

A.



B.

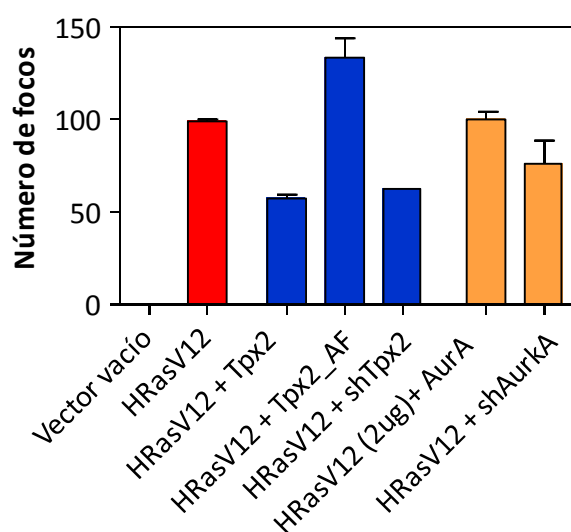


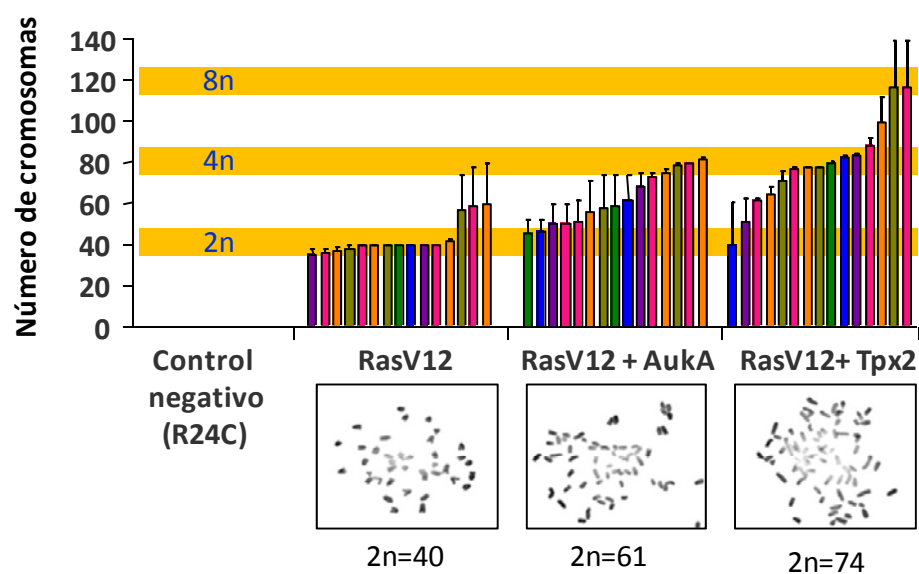
Figura 40: La sobreexpresión de Tpx2 *per se* no es capaz de inducir la transformación maligna de células. (A) Cuantificación del número de focos. No se obtuvieron focos al sobreexpresar distintas concentraciones de Tpx2 (2ug, 4ug y 8ug). Los resultados están normalizados frente al número de focos obtenidos al sobreexpresar el oncogén HRasV12. La sobreexpresión de Tpx2 inhibe el efecto de transformación maligna que tiene HRasV12 (***, $p > 0,001$). La sobreexpresión de la quinasa Aurora A coopera co HRasV12 en la transformación maligna de fibroblastos inmortalizados. (B) La inhibición de transformación maligna por HRasV12 es dependiente de la formación del complejo Tpx2/AurkA. La inhibición de Tpx2 (mediante shRNA) provoca una disminución en el número de focos al compararlo con las sobreexpresión de HRasV12 en el mismo grado que lo hace la reducción de los niveles de Aurora A. Los datos están relativizados al número de focos producidos por la sobreexpresión de HRasV12.

Como ya se ha mencionado, existe una correlación clara entre la sobre-expresión de Tpx2 y la presencia de inestabilidad cromosómica en tumores humanos (Carter et al., 2006). Nuestro siguiente objetivo fue comprobar si la sobre-expresión de Tpx2 tenía el mismo efecto *in vitro*. Para ello, aislamos las colonias procedentes del ensayo de focos ya descrito y establecimos

cultivos independientes. Mantuvimos las células en cultivo durante 4 semanas y analizamos los cariotipos mediante tinción con Giemmsa y conteo de cromosomas, así como mediante cariotipado espectral (SKY; del inglés *spectral karyotyping*). Las células que sobreexpresan HRasV12 presentaron cariotipos que correspondían a dotaciones 2n y 4n del material genético, es decir, presentaron poliploidías. Sin embargo, aquellas células que, además del oncogén, sobreexpresaban Aurora A, presentaron cariotipos que variaban entre las dotaciones 2n y 4n (Figura 41 A). La variabilidad de estos cariotipos demuestra la presencia de inestabilidad cromosómica en estas células. En el caso de las células que sobreexpresaban Tpx2, esta inestabilidad se vio incrementada y los cariotipos eran variables entre las dotaciones 2n, 4n y 8n (Figura 40 A y B).

Todos estos resultados demuestran que, igual que sucede con otros reguladores mitóticos como Aurora A o Mad2, tanto la sobreexpresión como la reducción en los niveles de Tpx2 da lugar a alteraciones en la segregación cromosómica que tienen como consecuencia la pérdida de estabilidad cromosómica, la transformación maligna de las células y, finalmente, el desarrollo de tumores tanto en ratón como en humanos.

A.



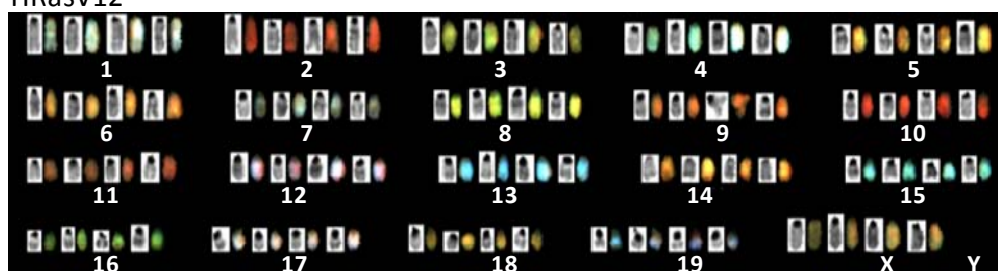
B.

Cariotipo Espectral (SKY)

Control negativo (R14C)



HRasV12



HRasV12 + Tpx2

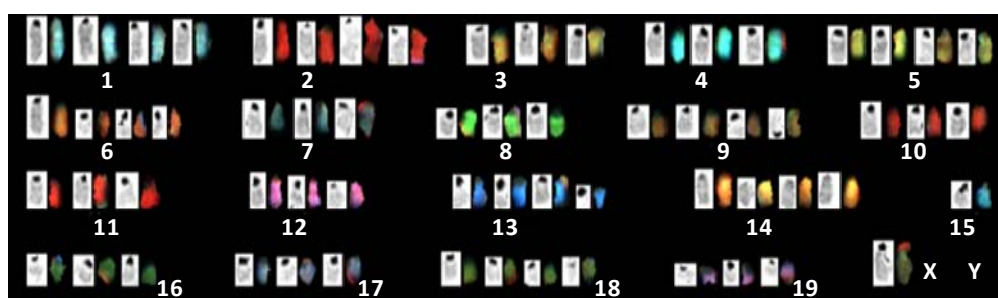


Figura 41: La sobreexpresión de Tpx2 en células transformadas provoca un aumento en la inestabilidad cromosómica. (A) Se llevó a cabo el análisis del cariotipo de células transformadas aisladas del ensayo de focos descrito. Las células control presentan dos poblaciones, una diploide y otra tetraploide. Las poblaciones que sobreexpresan Tpx2 o AurKA junto con HRasV12 acumulan inestabilidad y llegan a dar lugar a poblaciones con dotación cromosómica mayor de 8n. **(B)** El análisis espectral de cariotipos demostró la presencia de alteraciones cromosómicas en células que sobreexpresan Tpx2. Las células con niveles elevados de Tpx2 muestran alteraciones numéricas en varios cromosomas (11, 12 y 8 entre otros).

5. Tpx2 es un gen esencial durante la vida adulta del ratón

Ya hemos descrito que Tpx2 es un gen esencial para el desarrollo embrionario temprano del ratón (Figura 20). Pero, ¿cuáles son las consecuencias de la pérdida de expresión de esta proteína en un individuo que ha llegado a la vida adulta con los niveles normales de Tpx2? Con el objetivo de entender hasta qué punto Tpx2 es un gen esencial en la vida adulta, llevamos a cabo su eliminación condicional en ratones adultos.

5.1. La eliminación de Tpx2 en ratones adultos provoca un fallo hepático agudo incompatible con la vida.

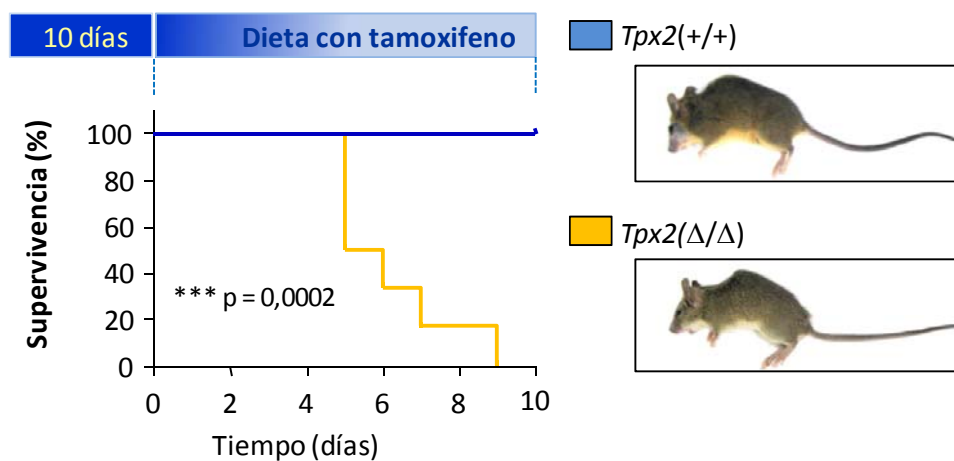
Para la obtención de ratones condicionales que nos permitieran controlar la eliminación de Tpx2 en el tiempo, cruzamos animales *Tpx2*(lox/lox) o *Tpx2*(+/+) con animales que expresaban la recombinasa Cre fusionada al receptor de estrógenos y bajo la regulación del promotor de la RNA polimerasa II, ratones *RERTn*(ERT/ERT). La fusión con el receptor de estrógenos hace que la expresión de la recombinasa sea dependiente de la presencia de tamoxifeno, por tanto, los ratones *Tpx2*(lox/lox) crecerían como ratones salvajes en ausencia de tamoxifeno, sin embargo, la presencia de esta hormona nos permitiría obtener ratones *Tpx2*(Δ/Δ) en los que la expresión del gen está totalmente impedida.

Para eliminar la expresión de Tpx2 en individuos adultos, alimentamos ratones de genotipo *Tpx2*(lox/lox); *RERTn*(ERT/ERT) y animales control *Tpx2*(+/+); *RERTn*(ERT/ERT) con una dieta suplementada con tamoxifeno. Utilizamos los ratones *Tpx2*(+/+) tratados con la misma

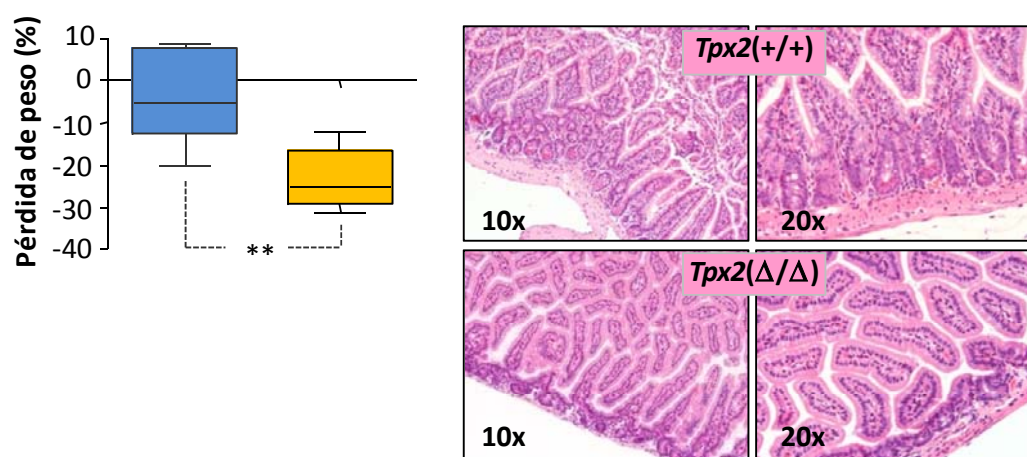
dieta como control de los posibles efectos secundarios inducidos por esta dieta suplementada. El tratamiento con tamoxifeno tuvo un efecto dramático en aquellos animales que portaban los dos alelos condicionales de *Tpx2*. El 83.4% de los animales *Tpx2*(Δ/Δ) murieron durante los 10 primeros días de tratamiento, empezando a ser visibles los síntomas de enfermedad a partir del cuarto día de tratamiento (Figura 42 A). Esta rápida letalidad vino acompañada de un descenso de peso muy brusco, que fue significativamente mayor en el caso de los ratones *Tpx2*(Δ/Δ) ($p=0,027$)(Figura 42 B). El análisis histopatológico de las muestras de los ratones enfermos nos demostró que esta pérdida de peso no se debía a alteraciones en el sistema digestivo (Figura 42 B). Ni la histología del sistema digestivo ni su capacidad proliferativa presentaban diferencias entre los ratones *Tpx2*(Δ/Δ) y *Tpx2*(+/+) (Figura 42 C). Los análisis histopatológicos completos de los animales *Tpx2*(Δ/Δ) revelaron que el hígado era el único órgano afectado. El resto de tejidos analizados no presentaba ninguna alteración anatómica o histológica (Figuras 43 y 44).

El fenotipo del hígado se caracterizó por la presencia de áreas necróticas sin una distribución determinada aparente, es decir, sin asociación a la triada portal o venas centrolobulillares. Estas zonas presentaban una apoptosis muy avanzada con presencia de las denominadas “células fantasma” anucleadas y eosinofílicas (Figura 44 A). Mediante el marcaje de la caspasa 3 activa (C3A; del inglés *caspase 3 active*) pudimos detectar un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas en los animales deficientes en la expresión de *Tpx2* (Figura 44 A). Mientras que los ratones *Tpx2*(+/+) no presentaban ninguna célula apoptótica en el hígado, hasta el 30% de los hepatocitos de ratones *Tpx2*(Δ/Δ) fueron positivos para C3A. Estas alteraciones tan dramáticas en el hígado pueden afectar su función y fisiología de tal modo que podemos considerarlas como la causa de la muerte temprana de los ratones *Tpx2*(Δ/Δ).

A.



B.



C.

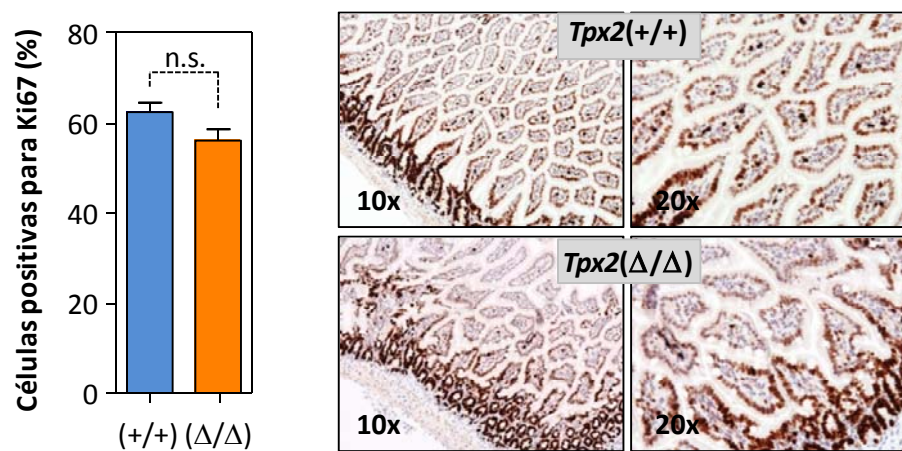


Figura 42: Tpx2 es un gen esencial en ratones adultos. (A) Dos cohortes de ratones adultos (11 semanas) fueron alimentados con dieta suplementada con tamoxifeno. Este tratamiento provocó la muerte en el 88% de los ratones *Tpx2*(Δ/Δ). Esta dieta no provocó ningún efecto deletéreo en ratones de genotipo salvaje sometidos al mismo tratamiento. Se muestra la curva de supervivencia de ambas cohortes (***) $p < 0,001$). (B) La letalidad del tratamiento vino acompañada de una pérdida de peso muy severa (**; $p < 0,005$). El sistema digestivo de ambos genotipos no presentaba ninguna alteración anatómica como se puede observar en las tinciones con hematoxilina/eosina (derecha). (C) Los ratones *Tpx2*(Δ/Δ) no presentaron alteraciones en la capacidad proliferativa del sistema digestivo (n.s; $p > 0,01$). Se muestran imágenes representativas del marcaje con Ki67.

La primera cuestión que quisimos resolver fue si este fallo hepático se debía al procesamiento del tamoxifeno en el hígado. Este tratamiento podía ser tóxico para el organismo, dando lugar a alteraciones que no estaban relacionadas con la pérdida de expresión de *Tpx2*. Frente a daños de este tipo, los hepatocitos activan su ciclo con el objetivo de regenerar las zonas afectadas del hígado (Michalopoulos, 2007). Para confirmar esta hipótesis analizamos la capacidad proliferativa en ambas cohortes de ratones, teniendo en cuenta que en estado basal la proliferación del hígado es prácticamente nula. Como mostramos en la figura 44, el porcentaje de células positivas para Ki67 resultó significativamente mayor en las muestras de ratones *Tpx2*(Δ/Δ) que en las de los *Tpx2*(+/+) (2,5% de las células *Tpx2*(+/+) vs 22,75% de las *Tpx2*(Δ/Δ); * $p < 0,05$). Este resultado nos indicaba que las alteraciones en el hígado no se debían a un efecto tóxico del tamoxifeno ni a alteraciones en la capacidad regenerativa de los hepatocitos de individuos *Tpx2*(Δ/Δ).

Teniendo en cuenta el fenotipo de las células *Tpx2*(Δ/Δ) que hemos descrito en apartados anteriores, ¿cómo era posible un aumento en la capacidad proliferativa de los hígados tratados con tamoxifeno y, por tanto, deficientes en *Tpx2*?

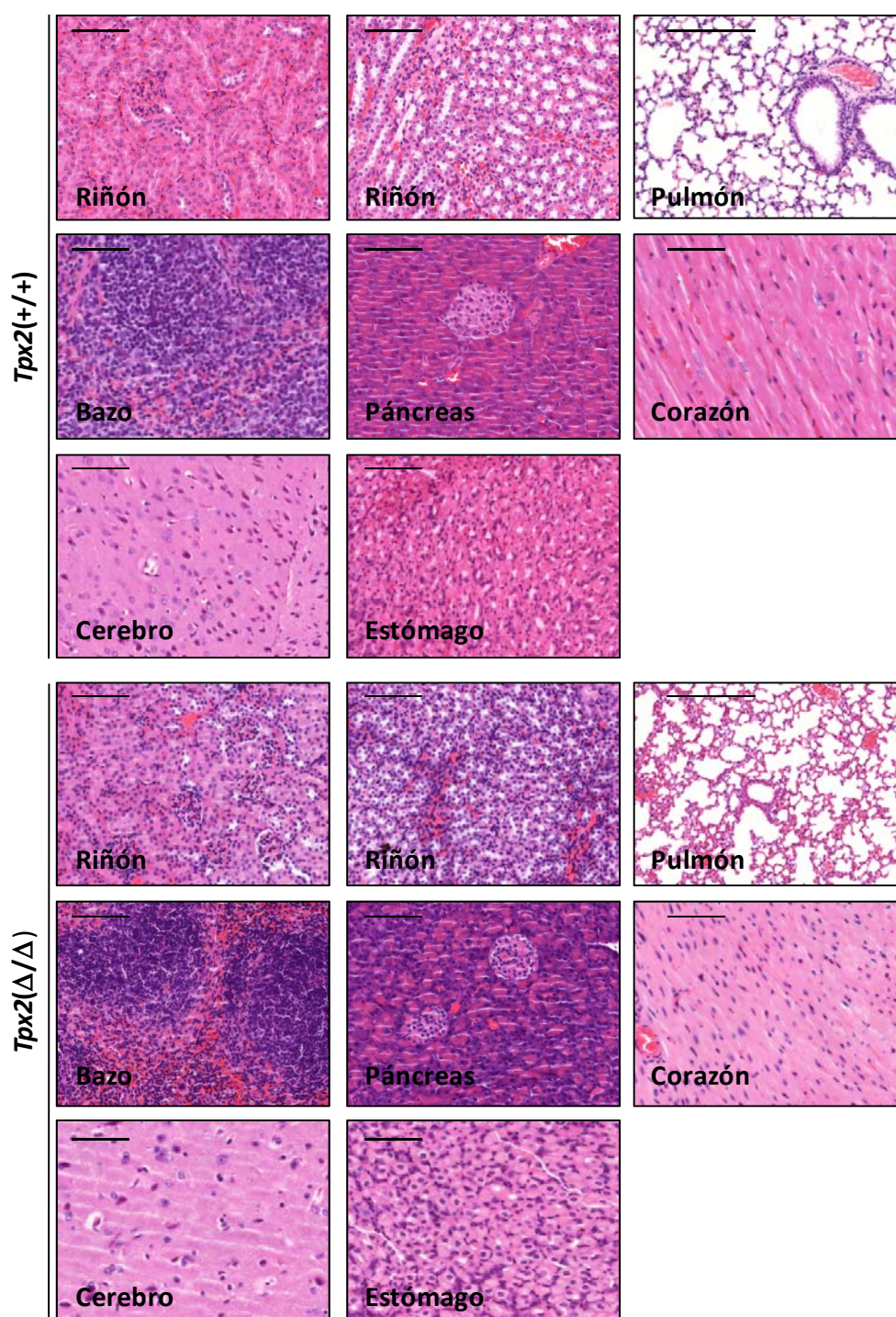
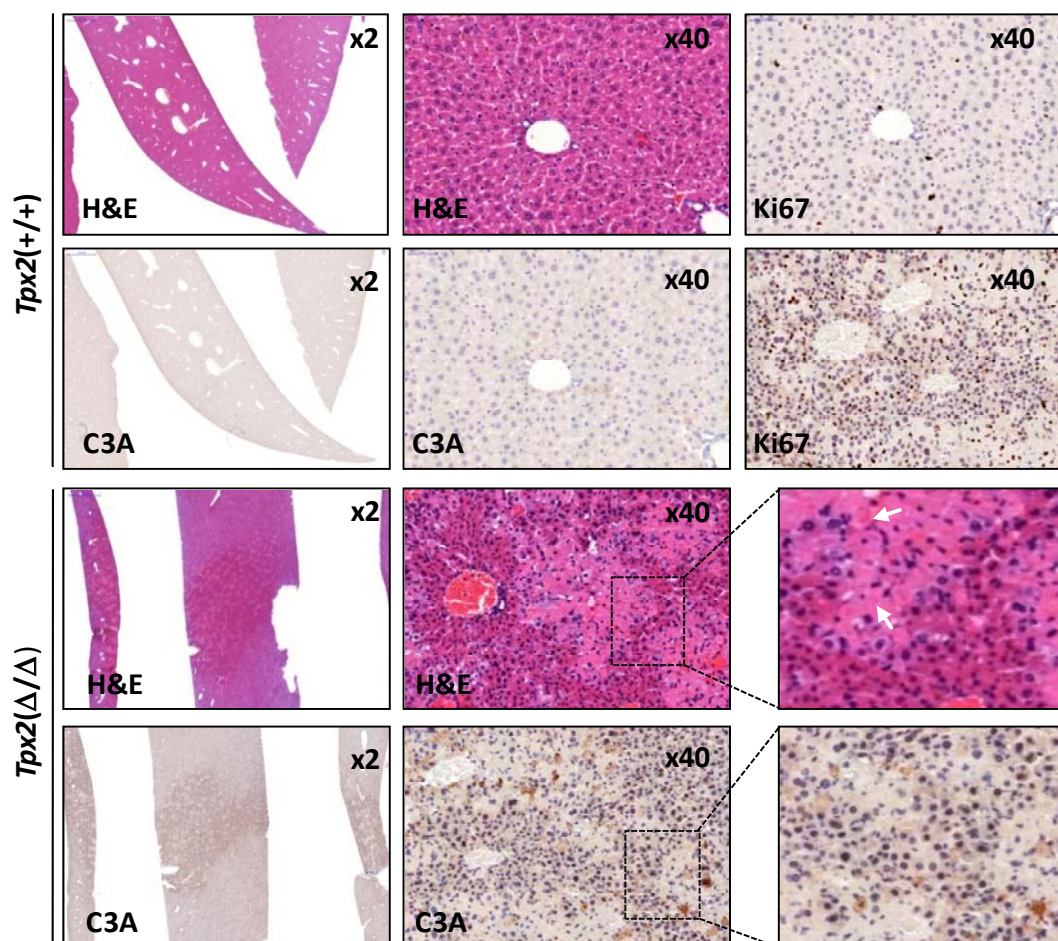


Figura 43: Los ratones adultos *knock-out* para *Tpx2* no presentaron alteraciones anatómicas en la mayoría de los órganos analizados. Se muestran imágenes representativas de tinciones con hematoxilina y eosina de ratones *Tpx2*(+/-) y *Tpx2*(Δ/Δ). Barras de escala: 100μm en riñón, bazo, páncreas, corazón, cerebro y estómago. 200μm en pulmón.

A.



B.

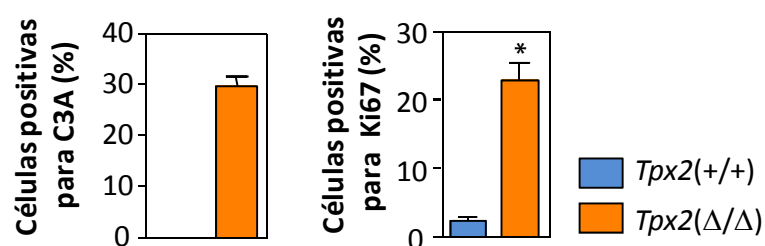


Figura44: Tpx2 es un gen esencial para el mantenimiento de la homeostasis del hígado. (A) Los ratones *Tpx2*(Δ/Δ) presentaron alteraciones en el hígado que eran visibles incluso a muy pocos aumentos (x2). Se puede observar un incremento dramático en el porcentaje de células apoptóticas (Caspasa 3 Activa). **(B)** El histograma izquierdo muestra el porcentaje de células positivas para C3A. La capacidad proliferativa de los hepatocitos no se ve alterada tras el tratamiento. El marcador de proliferación Ki67 se utilizó para analizar la capacidad regeneradora del hígado dañado.

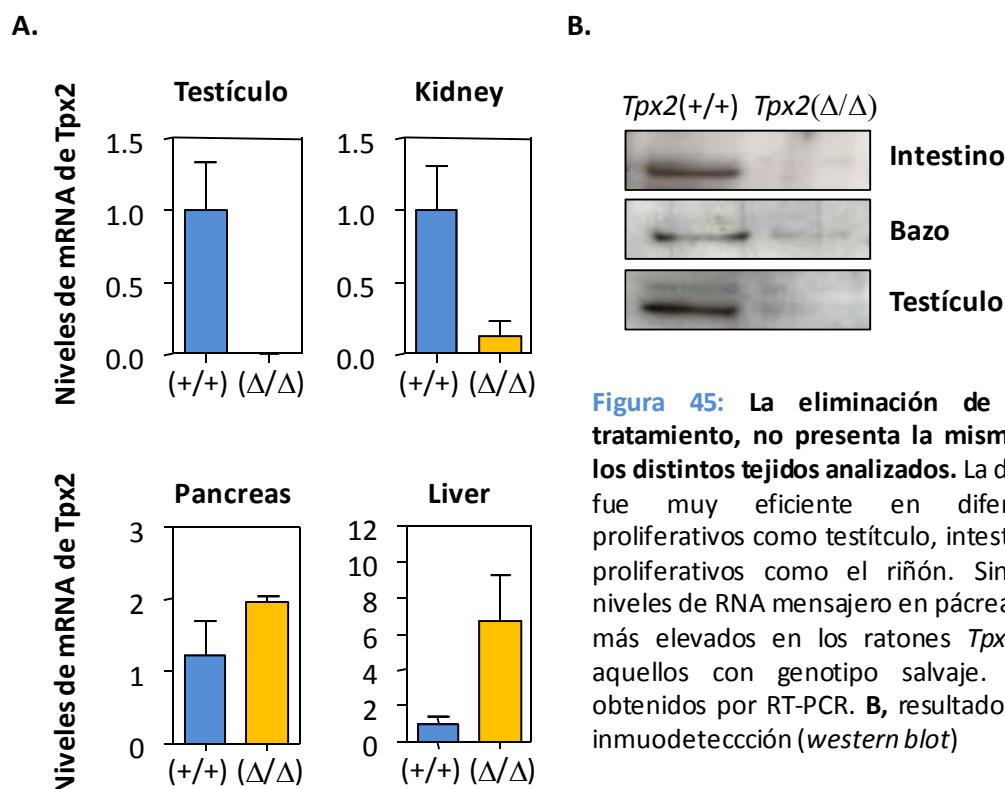


Figura 45: La eliminación de Tpx2 tras el tratamiento, no presenta la misma eficiencia en los distintos tejidos analizados. La delección de Tpx2 fue muy eficiente en diferentes tejidos proliferativos como testículo, intestino y bazo o no proliferativos como el riñón. Sin embargo, los niveles de RNA mensajero en páncreas e hígado eran más elevados en los ratones *Tpx2*(Δ/Δ) que en aquellos con genotipo salvaje. **(A)** resultados obtenidos por RT-PCR. **(B)**, resultados obtenidos por inmunodetección (*western blot*)

Para comprobar que realmente estos hepatocitos eran deficientes en la expresión de Tpx2, analizamos los niveles de RNA mensajero mediante transcripción inversa y PCR cuantitativa. Para nuestra sorpresa comprobamos que los niveles de Tpx2 resultaron más elevados en el hígado de los animales *Tpx2*(Δ/Δ) que en aquellos con genotipo salvaje. Sin embargo, la expresión del RNA mensajero había disminuido de forma significativa en otros tejidos como fueron el bazo, los testículos o el sistema digestivo (Figura 45). Una posible explicación a estos resultados es que la pérdida de Tpx2 fuera más drástica en alguno de los tejidos que no presentaban alteraciones anatómicas significativas inducidas por el tratamiento con tamoxifeno. Sin embargo, el daño hepático inducía una reacción proliferativa encaminada a reponer las partes dañadas (Figura 46). Esta regeneración tisular conlleva la entrada en ciclo de un porcentaje elevado de células del hígado que, para poder dividirse, han de mantener niveles elevados de Tpx2. Por lo tanto, estas células habrían escapado a la acción de la recombinasa

Cre y, por consiguiente, mantenido el gen *Tpx2* intacto. Esta hipótesis, que es coherente con el hecho de que un tratamiento con tamoxifeno precisa de varias semanas para ser significativo en ratones adultos, permite explicar el inesperado aumento de células proliferativas en los hígados mutados (Figura 44 y 46). Esta suposición, unida al hecho de que la expresión de *Tpx2* en hígados normales es prácticamente indetectable, nos lleva a la hipótesis de que, quizás, el hígado no sea el primer órgano afectado por el tratamiento con tamoxifeno, sino que es otro órgano el que sufre una disminución en la expresión de *Tpx2* por debajo de cierto umbral mínimo necesario provocando, así, consecuencias fatales en la histología y fisiología del hígado de los animales *Tpx2*(Δ/Δ). Para caracterizar en profundidad este fenotipo, y poner a prueba nuestras hipótesis, llevamos a cabo análisis de sangre completos en busca de alteraciones en parámetros que monitorizaran la funcionalidad del hígado (Figura 47). Únicamente encontramos alteraciones significativas en los niveles de la fosfatasa alcalina y fósforo. Si bien encontramos niveles aumentados de alanina aminotransferasas (AAT), estas diferencias no resultaron significativas al compararlas con los niveles presentes en los ratones de genotipo salvaje.

Como ya mencionamos en la introducción, una de las principales funciones de *Tpx2* es la regulación de la activación y localización de la quinasa Aurora A. Por ello, la siguiente cuestión que nos planteamos fue si el fenotipo observado en los ratones *Tpx2*(Δ/Δ) podía ser debido a alteraciones en la regulación de esta quinasa mitótica. En el laboratorio contamos con el modelo condicional para Aurora A, por tanto, utilizamos la misma estrategia para eliminar la expresión de la quinasa en un ensayo paralelo con la delección de *Tpx2*. Pudimos reproducir el fenotipo hepático en los animales mutantes para *Tpx2*, sin embargo, aquellos ratones deficientes para Aurora A no presentaron, en ningún caso, alteraciones en el hígado (Figura 48 A y B).

Estos resultados demuestran que *Tpx2* puede estar llevando a cabo un papel en la regulación del metabolismo que es independiente de su papel en mitosis e independiente también de su función como principal regulador de la quinasa Aurora A. ¿Qué papel puede

estar jugando Tpx2 en esta regulación? Para abordar esta cuestión, comenzamos a trabajar *in vitro* con los MEFs condicionales, *Tpx2*(lox/lox) derivados de nuestro modelo condicional.

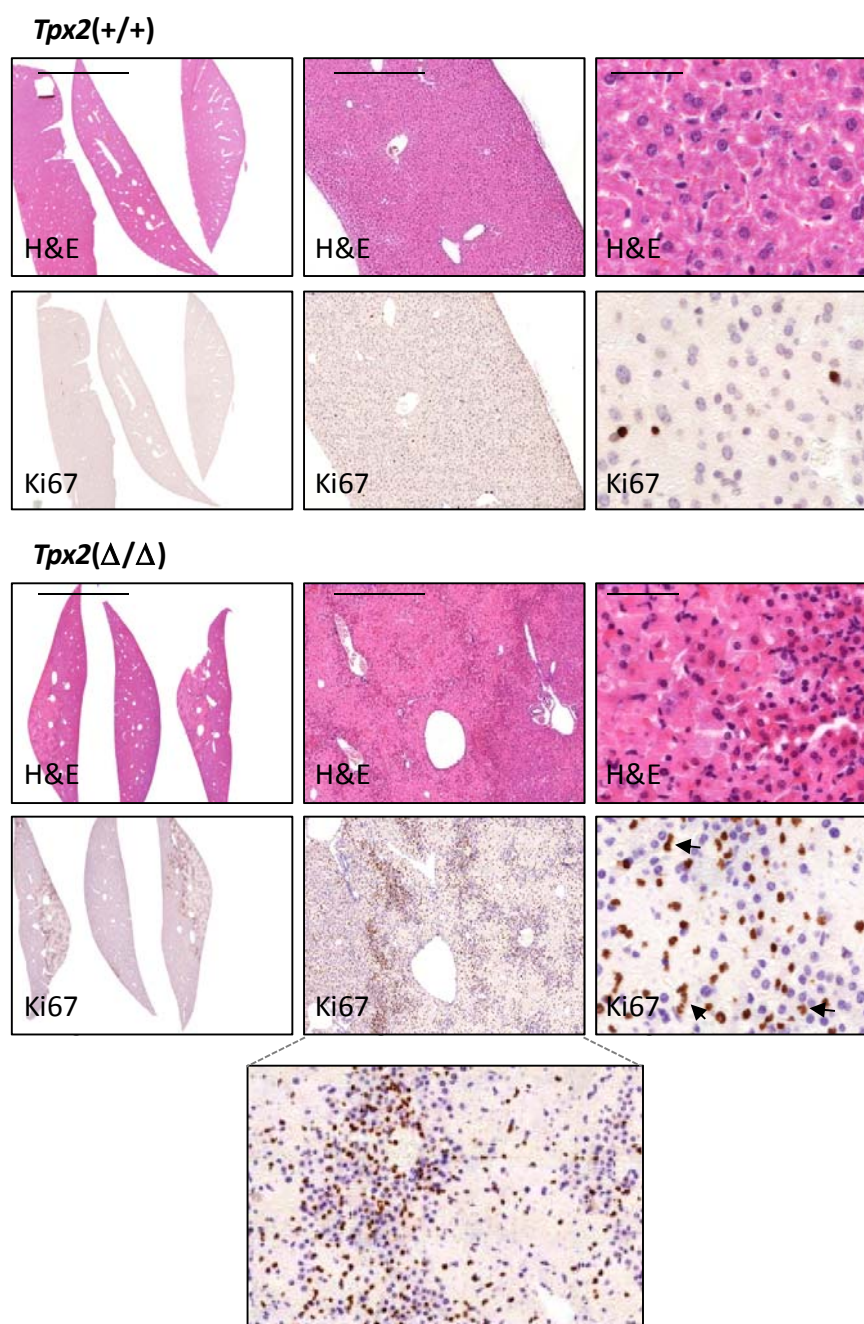


Figura 46: La eliminación de *Tpx2* provoca apoptosis masiva en el hígado que resulta en la presencia de células anucleadas eosinófilas. Los hepatocitos no afectados entran en ciclo con el objetivo de regenerar las zonas dañadas. Barras de escala: 5000μm, 500μm y 50μm (de izquierda a derecha).

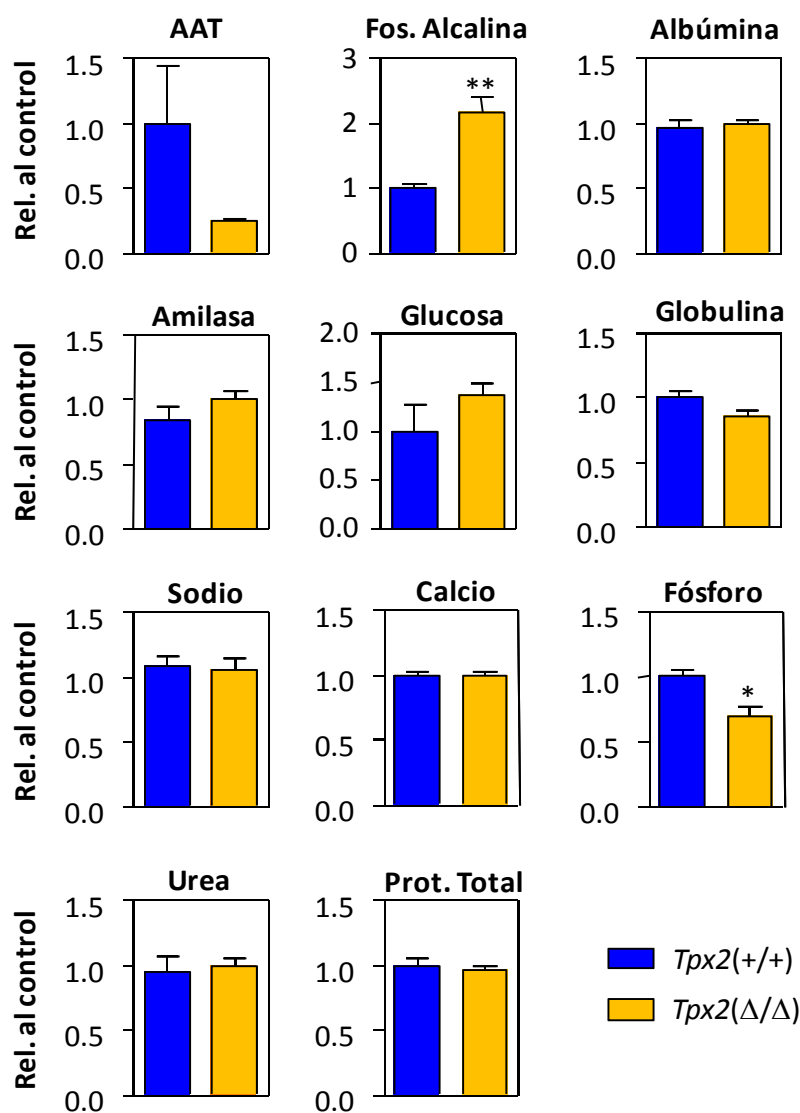
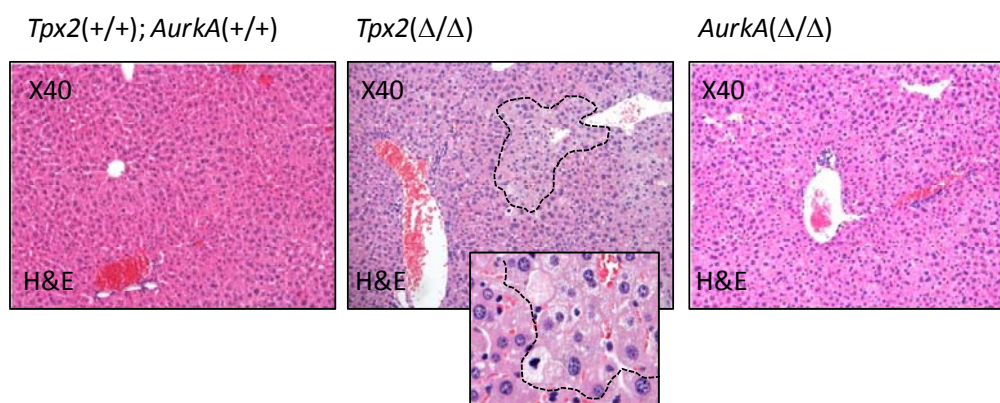


Figura 47: Los niveles de transaminasas y fosfatasa alcalina en ratones *Tpx2*(Δ/Δ) reflejan alteraciones en el funcionamiento del hígado. Los discos VetScan® de la casa Abaxis nos permitieron analizar varios parámetros en sangre. Sólo se encontraron diferencias significativas en los niveles de fosfatasa alcalina y fosfato, si bien encontramos una tendencia a niveles bajos de alanina aminotransferasa (AAT) así como una disminución en los niveles de glucosa (**, $p < 0,005$; *, $p < 0,05$). AAT: alanina aminotransferasa.

A.



B.

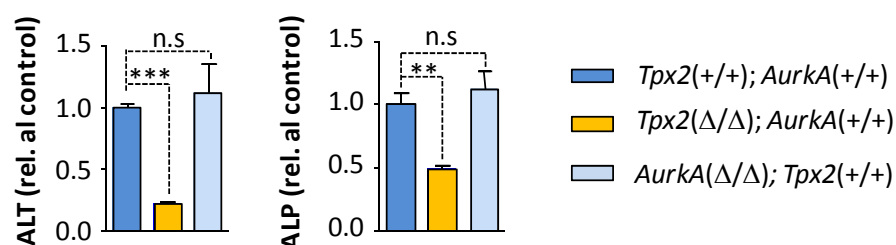


Figura 48: Tpx2 es un gen esencial para la vida de ratones adultos, independientemente de su función como regulador de la quinasa Aurora A. (A) Individuos adultos *AurkA*(lox/lox); *RERTn*(ERT/ERT) tratados con dieta suplementada con tamoxifeno no presentaron alteraciones en la anatomía e histología del hígado. **(B)** Los ratones deficientes en la expresión de Aurora A presentaron niveles de alanina aminotransferasa y fosfatasa alcalina comparables a los niveles presentes en individuos de genotipo salvaje (***, $p < 0,0001$; ** $p < 0,005$; n.s $p > 0,05$).

6. Tpx2 como regulador de la transducción de señales

La principal función de Tpx2 es regular la localización y activación de varias proteínas, Aurora A y Kif15 entre otras, mediante interacción directa con ellas (Eyers et al. 2003; Vanneste et al. 2011). Para entender los mecanismos mediante los cuales Tpx2 es capaz de regular el metabolismo y funcionalidad del hígado, llevamos a cabo una búsqueda de nuevas proteínas que pudieran interaccionar con Tpx2 y que explicaran las alteraciones encontradas en los

ratones *Tpx2*(Δ/Δ). Para ello, utilizamos la base de datos publicada por el Consorcio Europeo MitoCheck (<http://www.mitocheck.org/>). Este consorcio, constituido por varios grupos de investigación europeos, ha logrado entre otros hitos, caracterizar distintos complejos proteínicos en los cuales están incluidos numerosos reguladores mitóticos. Este análisis masivo se ha llevado a cabo mediante la utilización de RNA interferente realizado, uno por uno, sobre 22.000 genes (Hutchins et al., 2010). Para muchas de las proteínas analizadas, entre ellas *Tpx2*, este Consorcio Europeo ha podido describir nuevos complejos proteicos, abriendo nuevas posibilidades para las funciones de dichos genes.

El análisis informático de nuevas proteínas que interaccionan con *Tpx2* nos dio resultados muy interesantes (Figura 49). Según estos datos, *Tpx2* podría interaccionar con *Mad2*, así como con el receptor de insulina (INSR; del inglés *insulin receptor*) y con la nucleoproteína TPR (del inglés, *translocated promoter region*). Además, *Tpx2* podría interaccionar de forma directa con la subunidad reguladora de la fosfoinositol 3 quinasa, *p85 α* (PI3KR1).

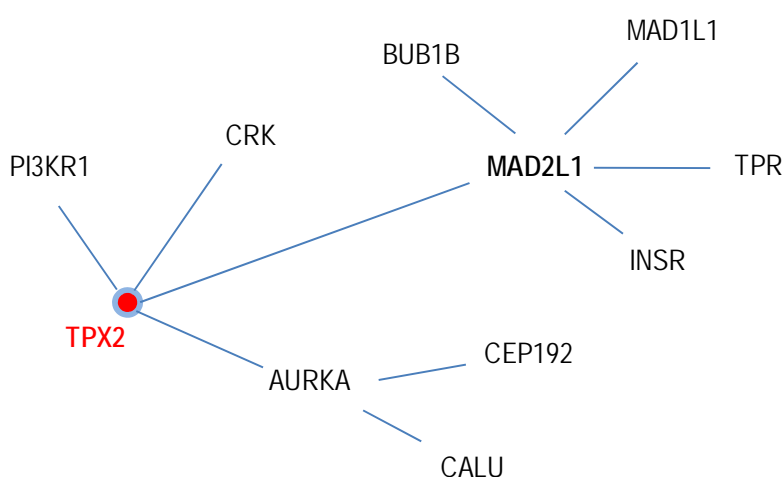


Figura 49: Predicción de interacciones obtenida a partir del análisis de los datos publicados por el Consorcio Europeo MitoCheck. *Tpx2* interacciona directamente con la quinasa Aurora A y con la subunidad reguladora de la fosfatidilinositol 3 quinasa. A través de su interacción con *MAD2*, *TPX2* interacciona con el receptor de insulina y con la proteína nuclear TPR.

6.1. *Tpx2* está implicado en la captación de glucosa en células de ratón

Dado el fenotipo encontrado en ratones adultos *Tpx2*(Δ/Δ), de entre los cuatro candidatos principales, MAD2, TPR, PI3K e INSR, fue éste último el primero que quisimos analizar con más detalle en nuestro sistema. La principal función del receptor de la insulina es el metabolismo de la glucosa (Saltiel and Kahn, 2001) y debemos tener en cuenta que el hígado es uno de los órganos que presenta concentraciones más elevadas de receptor de insulina (Cheatham and Kahn, 1995). Por ello, llevamos a cabo un análisis de la capacidad de captación de glucosa en nuestros MEFs *Tpx2*(Δ/Δ). Las células *Tpx2*(+/+) presentaron un perfil normal de captación y metabolismo de la glucosa marcada con tritio (Figura 50). Sin embargo los MEFs *Tpx2*(Δ/Δ) tienen esta función totalmente alterada. En concreto, el perfil que presentan estas células deficientes en la expresión de *Tpx2* es comparable al obtenido al tratar las células con Citocalasina B, un inhibidor de los receptores de glucosa (Figura 50).

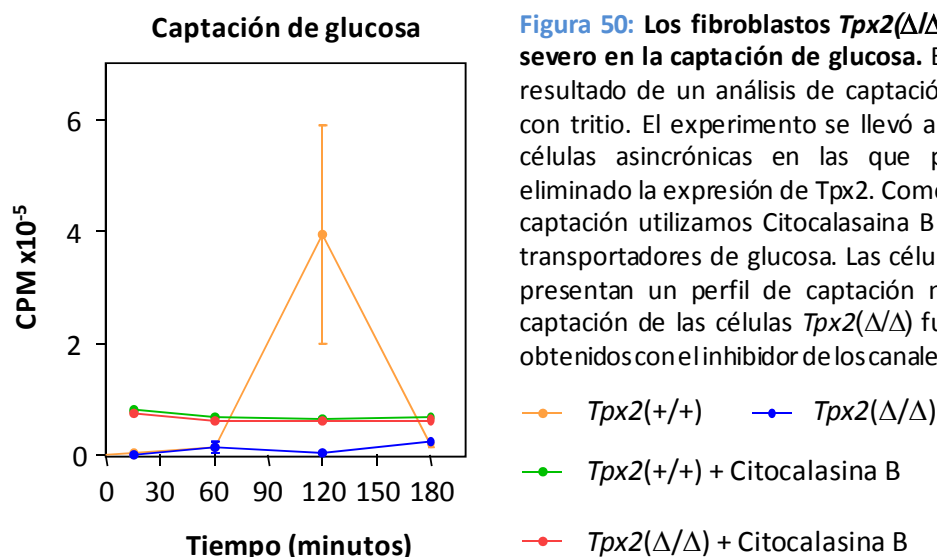


Figura 50: Los fibroblastos *Tpx2*(Δ/Δ) presentan un déficit severo en la captación de glucosa. El histograma refleja el resultado de un análisis de captación de glucosa marcada con tritio. El experimento se llevó a cabo en un cultivo de células asincrónicas en las que previamente se había eliminado la expresión de *Tpx2*. Como control negativo de la captación utilizamos Citocalasina B como inhibidor de los transportadores de glucosa. Las células de genotipo salvaje presentan un perfil de captación normal. Los niveles de captación de las células *Tpx2*(Δ/Δ) fueron comparables a los obtenidos con el inhibidor de los canales transportadores.

Este resultado nos demuestra que *Tpx2* puede tener una función reguladora del metabolismo mediante el control de la función del receptor de insulina. Para una captación de

glucosa óptima, es necesaria la activación de la Proteína quinasa B o Akt (PKB/AKT), responsable de la traslocación de los receptores de glucosa GLUT1 y GLUT4 a la membrana plasmática (Ng et al. 2002). El análisis de esta ruta en los MEFs *Tpx2*(Δ/Δ) nos demostró una alteración en la fosforilación de Akt (Figura 51). En concreto, la estimulación de *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(Δ/Δ) con suero fetal bovino al 20% tuvo como resultado la activación de la vía de Akt en los MEFs de genotipo salvaje, sin embargo, esta activación fue claramente deficiente en el caso de las células *Tpx2*(Δ/Δ) (Figura 51). Nuestros datos, por tanto, parecían indicar que Tpx2 controla la ruta de captación de la glucosa a través de la regulación de Akt. Tpx2 presenta localización nuclear en interfase (Garrett et al., 2002; Wittmann et al., 2000) (Figura 12), mientras que el receptor de insulina es una heteroproteína transmembrana. Por tanto, ¿cómo puede Tpx2, proteína nuclear, interaccionar con una proteína localizada en la membrana plasmática?

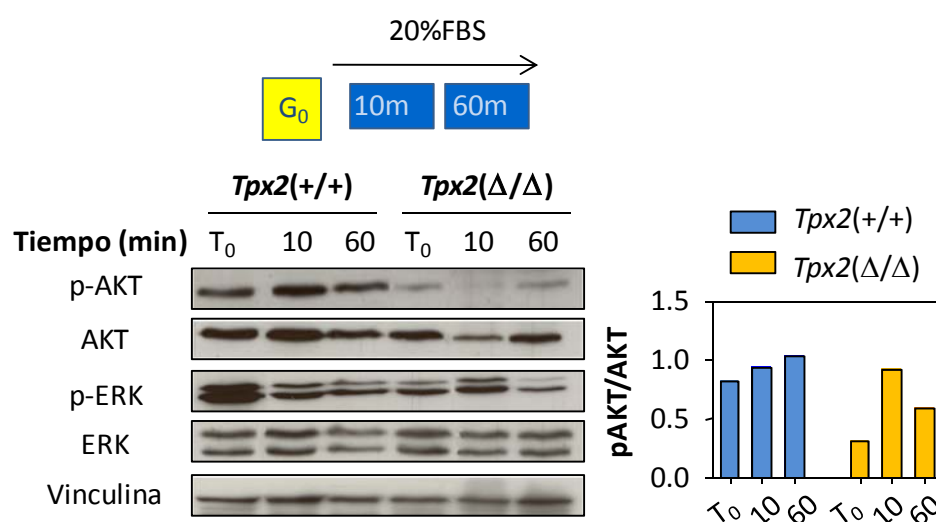


Figura 51: Disminución de la activación de Akt en células *Tpx2*(Δ/Δ). Tras un tratamiento de 72 horas en bajo suero (0.1% FBS), las células fueron estimuladas con suero al 20% durante 10 minutos ó 1 hora. Esta estimulación dio lugar a la activación de la ruta de Akt, determinada por sus niveles de fosforilación, en células *Tpx2*(+/+). Esta activación resultó menos eficiente en células *Tpx2*(Δ/Δ). No se encontraron diferencias en la fosforilación de ERK. El histograma muestra la relación entre la porción fosforilada de Akt y los niveles totales de la misma.

6.2. Tpx2 es necesario para la internalización de moléculas del citoplasma al núcleo

Varias de las proteínas implicadas en la vía del receptor de la insulina, incluidas el propio receptor, su primer sustrato directo IRS-1 (del inglés *insulin receptor substrate 1*) (Wu et al., 1997), AKT (Meier et al., 1997) así como ERK1/2 (Gripentrog and Miettinen, 2005) necesitan ser internalizadas del citoplasma al núcleo para regular de forma directa la expresión de diferentes genes asociados al metabolismo y la supervivencia celular (Figura 52). Como hemos comentado anteriormente, Tpx2 podría interaccionar con Mad2 y Tpr, ambas proteínas asociadas a los poros nucleares (Lee et al. 2008). Este hecho nos permite establecer una conexión entre el receptor de insulina y Tpx2, ambos localizados en el núcleo en determinados momentos del ciclo celular. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue analizar si Tpx2 pudiera estar implicado en la internalización del receptor de insulina en el núcleo, regulando así, entre otros, su función en el metabolismo de la glucosa. Analizamos primero la localización de Tpx2, Tpr y Mad2 durante interfase y pudimos confirmar que las tres proteínas presentan localización nuclear en interfase (Figura 53).

En un siguiente paso, quisimos estudiar el transporte entre el citoplasma y el núcleo en células deficientes en la expresión de Tpx2. En primer lugar, analizamos mediante inmunofluorescencia la localización del receptor de insulina en condiciones de bajo suero y tras la estimulación con FBS al 20%. En las células *Tpx2*(+/+) la estimulación con suero tuvo como consecuencia la internalización del receptor. Sin embargo, en las células *Tpx2*(Δ/Δ) el porcentaje de células en las que el receptor de insulina era nuclear fue el mismo en presencia y en ausencia de suero (Figura 54 A). Además, encontramos un descenso en el porcentaje de células que, bajo estimulación con suero, presentaban la forma fosforilada de Akt en el interior del núcleo (Figura 54 B). Este resultado fue confirmado por *western blot* para el sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1; del inglés *insulin receptor substrate-1*) (Figura 55).

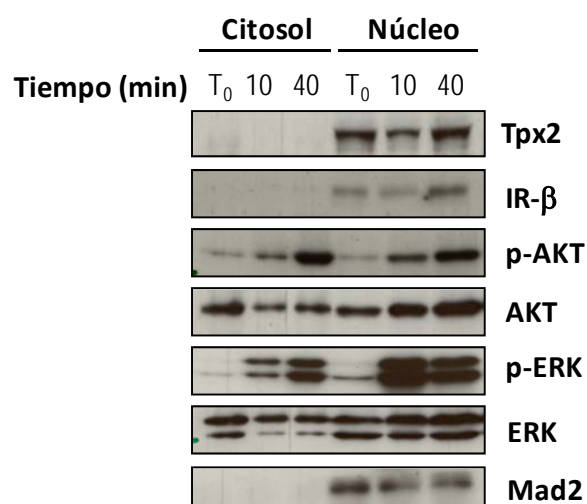


Figura 52: El receptor de la insulina, AKT y ERK pasan del citoplasma al núcleo tras la activación de la vía por unión de la insulina a su receptor. Internalización de la subunidad b del receptor de insulina, AKT y ERK tras la estimulación con suero de células quiescentes.

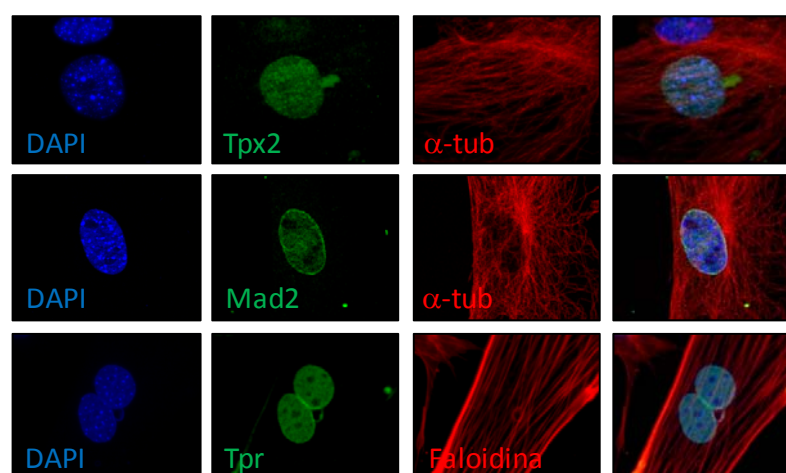
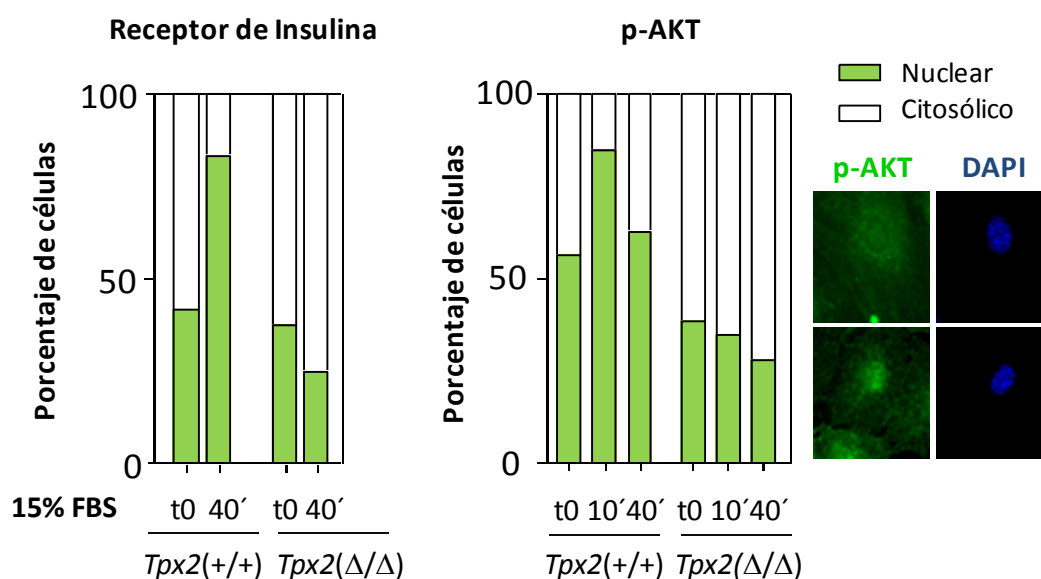


Figura 53: Localización nuclear de Tpx2, Mad2 y Tpr durante la interfase de células de ratón. El DNA, marcado con DAPI (azul). Tpx2, Mad2 y Tpr en verde. α -tubulina se utilizó para marcar los microtúbulos (rojo). La faloidina, en rojo, decora los filamentos de actina en los paneles inferiores.

A.



B.

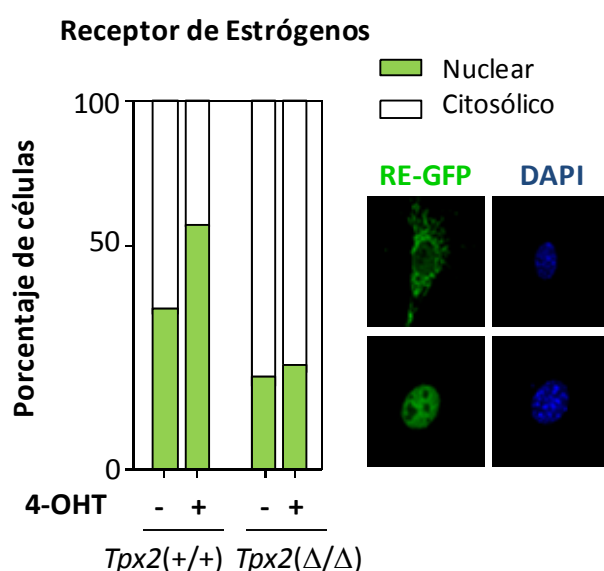


Figura 54: Las células deficientes en la expresión de *Tpx2* presentan alteraciones en el transporte de moléculas entre el citoplasma y el núcleo. **(A)** Localización del receptor de insulina y la forma fosforilada de Akt. Se muestra un histograma del porcentaje de células con localización citosólica o nuclear. **(B)** Localización de una forma exógena del receptor de estrógenos fusionada a la proteína fluorescente verde en fibroblastos de ratón *Tpx2*(+/-) y *Tpx2*(Δ/Δ).

Figura 54: Las células deficientes en la expresión de *Tpx2* presentan alteraciones en el transporte de moléculas entre el citoplasma y el núcleo. **(A)** Localización del receptor de insulina y la forma fosforilada de Akt. Se muestra un histograma del porcentaje de células con localización citosólica o

nuclear. **(B)** Localización de una forma exógena del receptor de estrógenos fusionada a la proteína fluorescente verde en fibroblastos de ratón *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(D/D).

Cabe esperar que este mecanismo de internalización por Tpx2 no sea exclusivo de la vía de activación del receptor de insulina. Para comprobar esta posibilidad, utilizamos un vector de expresión del receptor de estrógenos (RE) fusionado a proteína fluorescente verde. Mediante estimulación con 4-hidroxi-tamoxifeno, esta proteína de fusión RE-GFP pasaría al núcleo a través de los poros nucleares (Sebastian et al., 2004). Si Tpx2 juega un papel en la internalización de moléculas del citoplasma al núcleo, este mecanismo se verá afectado tras la eliminación del gen. Como se muestra en la figura 54, las células deficientes para Tpx2 presentan un defecto claro en la internalización del receptor de estrógenos. Estos resultados nos permitieron concluir que Tpx2 tiene un papel en la internalización de moléculas del citoplasma al núcleo.

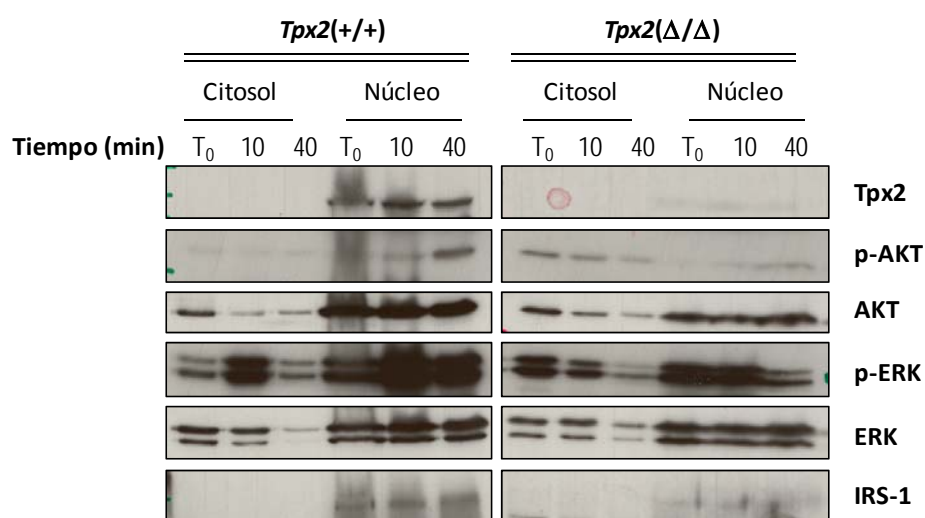


Figura 55: Las células *Tpx2*(Δ/Δ) presentan un déficit en la internalización del Sustrato del receptor de Insulina-1 (IRS-1). Tras estimular las células *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(Δ/Δ) con suero al 20% se analizó la fracción citosólica y nuclear de los extractos. Las células presentan una disminución en la capacidad de internalización de la AKT y del sustrato del receptor de insulina IRS-1.

Como hemos mencionado anteriormente, la internalización de distintos miembros de las ruta de transducción activada por la insulina tiene como consecuencia última la activación de la transcripción de genes relacionados con el metabolismo (glucosa 6 fosfato, GLUT2, α -amilasa...) (O'brien et al. 1991). Por ello, como demostración final del papel de Tpx2 en la transducción de señales mediante la internalización de moléculas al interior del núcleo, llevamos a cabo ensayos de luciferasa que nos permitieron estudiar la transcripción de genes relacionados con el metabolismo en células *Tpx2*(Δ/Δ). Los MEFs deficientes en la expresión de Tpx2 presentaron una disminución significativa de los niveles de transcripción de genes regulados por factores de transcripción relacionados con el metabolismo (c-fos, c-jun, AP-1 y Ser). La transcripción de p19(ARF) se utilizó como control de un gen no asociado a rutas metabólicas no mostró diferencias significativas entre las muestras control y aquellas deficientes para Tpx2 (Figura 56).

Los resultados descritos en este apartado nos permiten sugerir que Tpx2 juega un papel esencial en la transducción de señales mediante la regulación de la internalización de moléculas desde el citoplasma al núcleo.

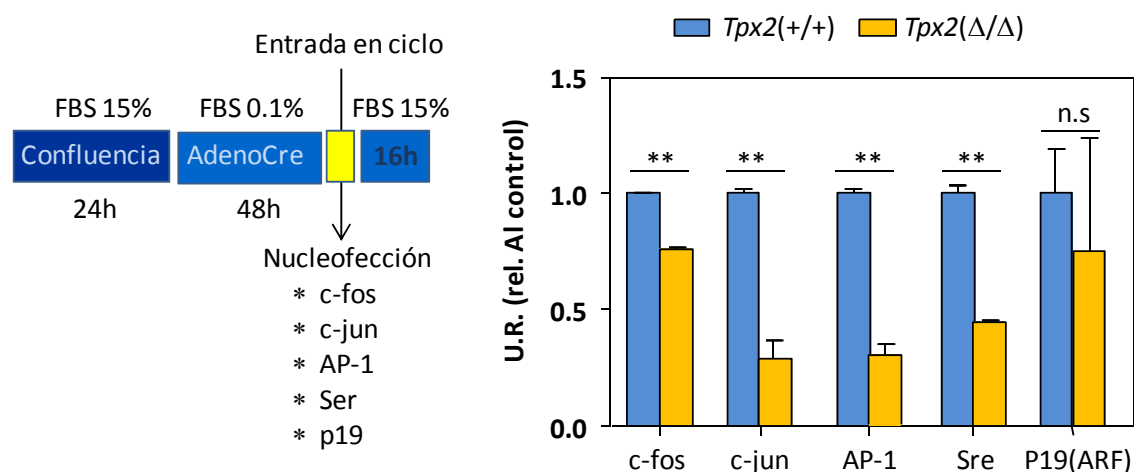


Figura 56: Tpx2 regula la transcripción de genes implicados en metabolismo. Niveles de transcripción de genes implicados en metabolismo cuantificados mediante ensayos de luciferasa. La transcripción de p19(ARF) se utilizó como control negativo. Encontramos disminuciones significativas en la transcripción de genes regulados por c-jun, c-fos y AP-1 (**, $p < 0,005$; n.s., $p > 0,05$).

DISCUSIÓN

La correcta segregación de los cromosomas requiere la coordinación de la actividad de un gran número de proteínas y procesos biológicos que tienen en el huso mitótico su base estructural. El equilibrio de fuerzas establecidas por los microtúbulos juega un papel crucial en el establecimiento de este huso y en el correcto posicionamiento de los cromosomas durante mitosis. Si bien los microtúbulos constituyen la unidad estructural básica del huso, es necesaria la intervención de otras proteínas que regulen su función. Así, son necesarias las MAPs y los motores moleculares (quinesinas) que influirán en la dinámica, organización e interacción de los microtúbulos con los cromosomas (revisado en Wittmann et al., 2001). La función biológica de las quinesinas, que obtienen la energía de la hidrólisis del ATP, se basan en las capacidades motoras que poseen: velocidad, procesividad y direccionalidad. Estos motores moleculares requieren estar sometidos a una regulación temporal y espacial muy precisa de su actividad y es en este proceso donde reside la importancia de las MAPs y, entre ellas, de Tpx2.

El trabajo con líneas celulares nos permite llegar a entender los mecanismos que explican los procesos biológicos complejos, sin embargo el trabajo con modelos animales otorga una nueva dimensión. El estudio de la biología celular en el contexto fisiológico de un organismo permite estudiar cómo la célula responde a señales externas procedentes de otros tipos celulares y del entorno. Por ello, el trabajo con modelos animales puede abrir las puertas al estudio de nuevas funciones de proteínas antes sólo estudiadas *in vitro*. Este es el caso de la proteína Tpx2, cuya función mitótica ha sido profundamente estudiada en modelos celulares. Antes de comenzar este proyecto, no se conocía hasta qué punto Tpx2 era un gen esencial para el desarrollo embrionario o para la vida del adulto, si llevaba a cabo funciones más allá de la regulación de la mitosis o cuál era su implicación en la formación y progresión tumoral en humanos.

Este trabajo, cuyo principal objeto de estudio ha sido la molécula Tpx2, se ha ramificado hasta campos en un principio insospechados, generando una figura geométrica con vértices tan

diversos como son la formación del huso mitótico, la inestabilidad cromosómica, los procesos tumorales y la regulación metabólica de células y organismos. En los siguientes apartados se discutirá sobre la relación de Tpx2 con todos estos procesos y enumeraremos todas aquellas puertas que han sido abiertas gracias a este estudio.

1. El huso mitótico: una estructura esencial durante el desarrollo embrionario

En este trabajo hemos podido demostrar que la ausencia de Tpx2 causa letalidad embrionaria temprana durante el desarrollo preimplantacional del ratón. Los embriones deficientes en la expresión de Tpx2 son incapaces de progresar más allá de la etapa de mórula compactada. Esto se debe a un establecimiento aberrante del huso mitótico, que tiene como resultado alteraciones en la segregación cromosómica. En la mayoría de los casos no encontramos alteraciones durante los dos primeros ciclos llevados a cabo por las células que constituyen el embrión *Tpx2*(-/-). Este hecho se debe, muy probablemente, a la presencia de RNA mensajero de contribución materna. Sin embargo, en etapas más avanzadas, la expresión de Tpx2 *de novo* se hace indispensable para el desarrollo del embrión.

Otras MAPs o proteínas con funciones motoras son igualmente cruciales durante el desarrollo (Tabla 6). Eg-5 es una quinesina del extremo “+” de los microtúbulos implicada en la formación del huso bipolar mediante el control de la separación de los centrosomas y los polos del huso. La eliminación de esta proteína provoca la letalidad embrionaria temprana del ratón. Al igual que sucede tras la eliminación de Tpx2, los embriones deficientes para la expresión de Eg-5 alcanzan la fase de mórula compactada pero no pueden progresar más allá en el desarrollo. Esto se debe a la acumulación de células paradas en prometáfase, caracterizadas por husos monopolares que colapsan y no son capaces de alcanzar la etapa de blastocisto (Chauvière et al 2008). De igual forma, los embriones deficientes en la quinasa Aurora A, una de las quinasas más importantes implicadas en la formación del huso, también detienen su desarrollo en etapas muy tempranas siendo incapaces de realizar divisiones correctas (Cowley et al., 2008; Lu et al., 2007; Sasai et al., 2008). También ha sido descrita la letalidad embrionaria

causada por la ausencia de expresión de otros reguladores de la formación del huso como son NuMa, Tacc3, NuSAP y Rae1 (Silk et al., 2009; Piekorz et al., 2001; Ramesh Babu et al., 2001) (Tabla 6).

Como ya hemos mencionado, el control espacial de la mitosis es crucial para la correcta segregación del material genético y el gradiente de Ran-GTP es el principal responsable de esta regulación. Si revisamos los modelos de ratones *knock-outs* publicados para las principales proteínas reguladas por este gradiente como son HURP o NuMA, entre otros, (Tabla 6) podemos entender el importante papel que estas proteínas juegan en el desarrollo embrionario. Sólo la ausencia de HURP y RHAMM son compatibles con el desarrollo normal de los ratones, si bien las hembras deficientes en el HURP resultan no fértiles.

Tabla 6: Relevancia de los factores mitóticos regulados por Ran-GTP en el desarrollo embrionario.

Proteína	Función en mitosis	Fenotipo	Referencia
NuMA	Estabiliza los microtúbulos del polo de los polos del huso mitótico	Letalidad embrionaria	Silk et al. 2009
HURP	Regula la función la quinesina Kif18A	Infertilidad en las hembras (problemas de proliferación del tejido endometrial)	Tsai et al. 2008
TPX2	Regula la polimerización de microtúbulos dependiente de cromatina	Letalidad embrionaria (preimplantacional)	Aguirre-Portolés et al. 2012
RHAMM	Estabiliza lo microtúbulos en los polos del huso mitótico. Implicado en la migración celular	Viable. Desarrollo normal	Torg et al. 2003
TACC3	Estabiliza lo microtúbulos en los polos del huso mitótico	Letalidad embrionaria media-tardía	Piekorz et al. 2001
NuSAP	Estabiliza lo microtúbulos en los polos del huso mitótico	Letalidad embrionaria temprana: Problemas en el establecimiento de la masa celular interna del blastocisto	Bosch et al. 2010
Rae1	Polimerización de microtúbulos	Letalidad embrionaria temprana. Problemas en la formación de la masa celular interna del blastocisto	Ramesh Babu et al. 2003
NPM1	Duplicación de centrosomas	Letalidad embrionaria entre los días E11.5-E16.5. Anemia, alteraciones de la hematopoyesis primitiva	Grisendi et al., 2004
Kid	Quinesina. Regula la alineación de los cromosomas en la placa metafásica	Modelo animal no publicado	---
CDK11	Estabilizador de microtúbulos	Modelo animal no publicado	---
Kinesina 14	Control de la longitud del huso mitótico.	Modelo animal no publicado	---

2. Tpx2 como regulador del huso mitótico

Cuando las células forman el huso mitótico pueden polimerizar microtúbulos a partir de distintas fuentes: centrosomas, cromosomas (Heald et al., 1996; Maiato et al., 2004) y los propios microtúbulos (Mahoney et al., 2006; Wittich et al., 1980). Así mismo, durante el establecimiento del huso se pueden diferenciar dos procesos: la polimerización de los microtúbulos y su organización en una estructura bipolar. Se han realizado numerosos estudios para comprender qué mecanismos se encuentran detrás del establecimiento del huso bipolar. El primer modelo propuesto, de “búsqueda y captura”, atribuía a los centrosomas toda la responsabilidad de la polimerización. En este caso, los microtúbulos procedentes del centrosoma sufren ciclos de catástrofe y rescate y de manera estocástica establecen uniones con los cinetocoros de los cromosomas. En este modelo, los cinetocoros jugaban un papel pasivo, esperando a ser capturados por los microtúbulos (Gadde and Heald, 2004). Un modelo matemático publicado en 2005 por Wollman, fue el primer indicio contra la hipótesis de “búsqueda y captura”. Según este modelo matemático, si la captura de los cromosomas era un proceso azaroso y únicamente dependiente de la polimerización desde centrosomas, pasarían horas hasta que cada uno de los 92 cinetocoros humanos estableciera contacto con los microtúbulos. Sin embargo el tiempo medio de duración de la prometafase es de 15-30 minutos (Gotto and Wittels, 1980). Más importante aún, este modelo no explicaba cómo se formaba el huso mitótico bipolar en plantas superiores u oocitos que carecen de centrosomas. Más adelante se demostró, utilizando extractos de *X. laevis*, que la cromatina era una fuente adicional de polimerización de microtúbulos (Karsenti et al. 1984). Hoy sabemos que el gradiente de Ran-GTP que se forma durante mitosis y la activación de los factores asociados al huso que éste desencadena, son claves para la polimerización dependiente de cromatina.

Se ha descrito que Tpx2 es capaz de inducir la polimerización de microtúbulos cuando se añade a extractos de *X. laevis* (Gruss et al. 2001). Además, la eliminación de Tpx2 en células humanas impide la formación de microtúbulos alrededor de los cromosomas (Sampson et al., 1980; Bird and Hyman, 2008).

Nosotros hemos demostrado en nuestro sistema, que la ausencia de Tpx2 provoca un defecto severo en la polimerización de microtúbulos desde el DNA. Como consecuencia de este efecto y en concordancia con los resultados presentados por Bird y Hyman en 2008, las células deficientes en Tpx2 son capaces de formar un huso bipolar (colapsado) pero no de mantener la fidelidad de la división. Por ello, podemos afirmar que la polimerización de microtúbulos desde la cromatina no sólo está presente, si no que es necesaria para el establecimiento de un huso bipolar robusto y totalmente funcional en células de mamífero.

Las aberraciones más frecuentes que hemos encontrado en las células *Tpx2*(Δ/Δ) se corresponden con husos colapsados y multipolares. Estos polos adicionales no se deben a alteraciones en el ciclo de los centrosomas, sino que se deben a la rotura del material pericentriolar. Por ello, según nuestra hipótesis, el déficit en la polimerización de microtúbulos en células *Tpx2*(Δ/Δ) provoca un desequilibrio en las fuerzas de tiro y empuje de los microtúbulos sobre los cromosomas. Los polos llegan a separarse pero el huso no es lo suficientemente robusto y el desequilibrio de fuerzas provoca la rotura de los polos (Figura 57). En la mayoría de los casos, las células son capaces de salir de mitosis pero como una única célula poliploide. No hemos podido dilucidar cuál es el mecanismo molecular básico mediante el cual Tpx2 regula la formación de un huso bipolar funcional. Las funciones más estudiadas de Tpx2 son la activación y localización de Aurora A y la quinesina Kif15 (Kuffer et al., 2002; Wittman et al., 2000; Wittenburg, 1980; Tanenbaum et al., 2009). En células deficientes en la expresión de Tpx2, la polimerización desde los centrosomas parece normal, sin embargo son evidentes los defectos en la polimerización dependiente de la cromatina. Esto puede resultar en la falta de formación de fibras antiparalelas, dando lugar a un huso débil en el que las fuerzas de tiro y empuje que los microtúbulos ejercen sobre los cromosomas no están equilibradas. La falta de localización de Kif15 sería, probablemente, la causa de los problemas estructurales que presentan los husos deficientes en Tpx2 (Figura 57). Tpx2 es el encargado de localizar Kif15 en los microtúbulos, más concretamente en la zona próxima a la región ecuatorial, donde los microtúbulos de uno y otro polo forman estructuras antiparalelas (Tanenbaum et al. 2009; Vanneste et al. 2009). Ha sido demostrado recientemente que Kif15 es

capaz de llevar a cabo la formación del huso bipolar en ausencia de Eg-5 (Vanneste et al., 2009). Kif15 avanzaría entre los microtúbulos antiparalelos provocando la separación de los polos y el crecimiento del huso. Existen dos hipótesis al respecto: (i) Tpx2 sería capaz de entrelazar dos dímeros de Kif15 dando lugar a un tetrámero que podría interaccionar con los microtúbulos; (ii) Kif15 podría separar los polos mediante el avance en dirección al extremo “+” mientras permanecería anclado al microtúbulo antiparalelo a través de Tpx2 (Figura 58) (Vanneste et al., 2009). Coincidiendo con los resultados mostrados por el grupo de Patricia Wadsworth en células humanas, hemos demostrado que la eliminación genética de Tpx2 en MEFs no impide la localización de Eg-5 en los centrosomas y en los microtúbulos del áster. Este resultado, así como la presencia de Aurora A en los centrosomas, explica que estas células sean capaces de duplicar los centrosomas y dar lugar a un huso bipolar (aunque colapsado), sin embargo, la falta de localización de Kif15 sería la causa del desequilibrio de fuerzas, la rotura de los polos y la pérdida final de bipolaridad del huso.

Para entender hasta qué punto Kif15, Eg-5 o la quinasa Aurora A contribuyen al fenotipo encontrado en los fibroblastos deficientes en la expresión de Tpx2, sería necesario llevar a cabo experimentos de rescate mediante la expresión endógena de diferentes mutantes. Sin embargo, estos ensayos presentan la dificultad de que la pérdida de Tpx2 provoca alteraciones en la localización de estas proteínas. Sería necesario desarrollar un sistema que nos permitiera mantener la asociación de estas proteínas a los microtúbulos incluso en ausencia de Tpx2 y entender a través de qué efectores Tpx2 es capaz de regular la formación y elongación del huso bipolar.

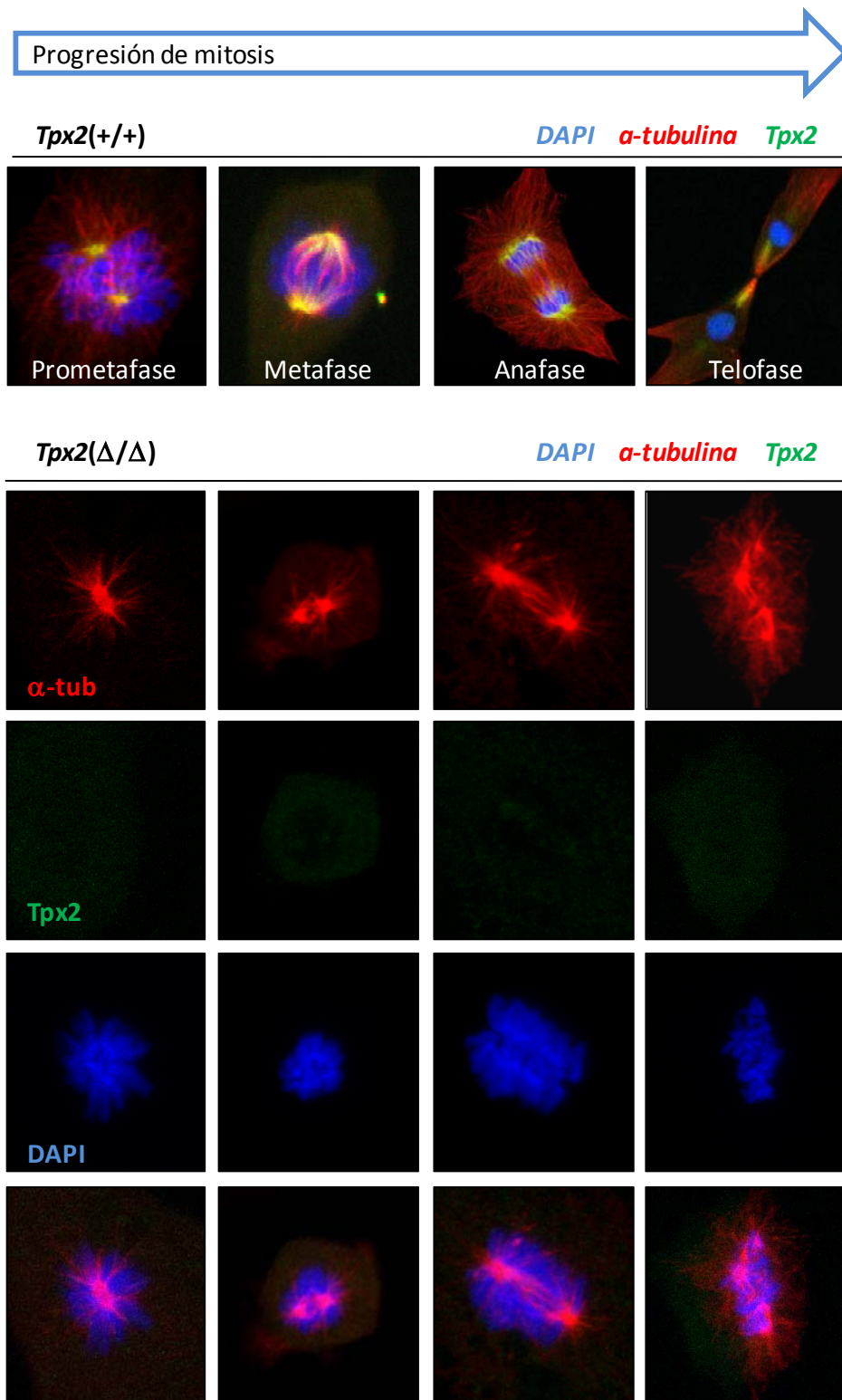


Figura 57: Progresión de mitosis en células *Tpx2*(Δ/Δ). En los paneles superiores mostramos la progresión normal de mitosis en una célula salvaje para *Tpx2*. Los paneles inferiores muestran la progresión en una célula *Tpx2*(Δ/Δ). Nuestra hipótesis propone que las alteraciones en la polimerización de microtúbulos dan lugar a husos colapsados con el balance de fuerzas de tiro y empuje desequilibradas y provocan, finalmente, la ruptura de los polos. La α -tubulina marca los microtúbulos en rojo, *Tpx2* está marcado en verde; en azul, el DAPI, marca el ADN.

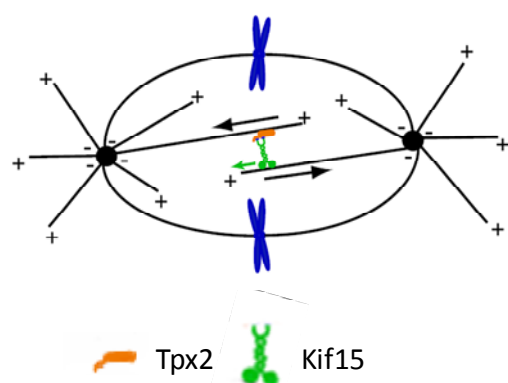


Figura 58: Regulación de Kif15 por *Tpx2*. El homodímero de Kif15 interaccionaría con uno de los microtúbulos a través de sus dominios motores y entraría en contacto con el microtúbulo antiparalelo a través de su interacción con *Tpx2* (Modificado de Tanenbaum et al., 2009).

3. *Tpx2*, no sólo un regulador de Aurora A.

Una de las funciones más estudiadas de *Tpx2* es la regulación de la actividad y localización de la quinasa Aurora A. Cuando *Tpx2* interacciona con Aurora A se produce un cambio de conformación en la quinasa que hace que su residuo Thr288 quede inaccesible a la desfosforilación por PP1 (Bayliss et al., 2003; Evers et al., 2003). También se ha demostrado, en células humanas, que *Tpx2* puede proteger a la quinasa Aurora A de la degradación dependiente del complejo APC/C-Cdh1 (Guibettini et al., 2010). De esta forma, *Tpx2* permite la estabilización de la actividad quinasa Aurora A. La función principal del complejo que forma Aurora A y *Tpx2* es la elongación del huso mitótico (Bird and Hyman, 2008). Así pues, las células deficientes en la formación de este complejo, si bien forman husos bipolares, éstos son más cortos y tienen una incidencia elevada de fallo en la mitosis.

Las células deficientes en la expresión de *Tpx2* necesitan más tiempo para entrar en mitosis que las células *Tpx2*(+/+), quedan paradas en prometafase por un tiempo y finalmente salen de mitosis sin segregarse en dos células hijas. Estas alteraciones también se han visto en

células primarias deficientes en la expresión de Aurora A (Lu et al., 2008; Cowley et al., 2009; Sasai et al., 2008). Estos fenotipos comunes son reflejo de que ambas proteínas actúan como un complejo en determinadas etapas de la mitosis. De hecho, la formación de este complejo es esencial para aspectos fundamentales de la biología del huso mitótico: separación de los polos, elongación del huso, polimerización de microtúbulos dependiente de cromatina así como el estabilización de las fibras (Bird and Hyman, 2008). También es cierto que existen diferencias en los fenotipos producidos por la eliminación genética de Aurora A cuando los comparamos con la eliminación de Tpx2, indicando funciones independientes de cada uno de los miembros del complejo. Por ejemplo, la eliminación condicional de Tpx2, pero no de Aurora A, resulta en un aumento significativo en el porcentaje de células que sufren apoptosis. Además, mientras que los husos monopolares son poco comunes en las células *knock-out* para Tpx2, esas figuras son las alteraciones más frecuentes en el caso de la eliminación de Aurora A, indicando que esta quinasa juega un papel crucial en la maduración y separación de los centrosomas independientemente de su interacción con Tpx2.

Nuestros ensayos *in vivo*, añaden argumentos que apoyan la existencia de funciones de Tpx2 que son independientes de la regulación de la quinasa Aurora A. La eliminación de Tpx2 en ratones adultos provoca un fallo hepático agudo que resulta en la muerte del animal. Sin embargo, el mismo procedimiento en ratones condicionales para la quinasa Aurora A no provoca alteraciones en el hígado. En este caso, la eliminación genética de Aurora A provoca inhibición de proliferación celular, aneuploidías y senescencia (Pérez de Castro et al.; manuscrito en preparación).

La muerte de los animales tras la eliminación de Tpx2 es tan rápida que no debería estar asociada a fallos en la regulación del ciclo celular por parte de Tpx2. Además, no se han detectado defectos en tejidos proliferativos como son el intestino o la piel. Estos resultados resaltan el hecho de que, mientras la formación del complejo Aurora A/Tpx2 ejerce funciones esenciales durante mitosis las funciones que Tpx2 realiza durante interfase podrían ser independientes de la regulación de la quinasa.

En lo referente a las funciones que Tpx2 lleva a cabo en la regulación del metabolismo y la regulación de transducción de señales, queda aún pendiente la demostración de si éstas son o no funciones dependientes de la quinasa Aurora A. La prueba definitiva vendrá de experimentos de rescate realizados con Tpx2 salvaje y con el mutante incapaz de interaccionar con Aurora A. De esta forma y usando como modelo experimental el estudio de la internalización de los efectores de la ruta activada por la insulina, así como la activación de Akt y el metabolismo de la glucosa.

4. Tpx2: más allá de la regulación de la mitosis.

La eliminación de Tpx2 en ratones adultos provoca un daño severo en el hígado que resulta en la muerte temprana de los animales. Al encontrarnos con este fenotipo surgen tres preguntas casi de inmediato: ¿Es el papel de Tpx2 en mitosis la raíz del problema hepático? ¿Se trata de un fenotipo dependiente del complejo Tpx2/Aurora A o es independiente de la quinasa? ¿Es el hígado el primer y único órgano afectado por la pérdida de Tpx2?

La rápida muerte de los animales, la falta de alteraciones en órganos proliferativos (piel, bazo o intestino), así como el hecho de que ninguno de los modelos animales de reguladores mitóticos generados en nuestro laboratorio presenten este fenotipo nos permiten afirmar, casi con total seguridad, que el fenotipo en el hígado es independiente de la función de Tpx2 en la regulación de la mitosis. La eliminación genética de Aurora A no provoca alteraciones en la histología del hígado y no altera los niveles normales de enzimas hepáticas como la alanina aminotransferasa o la fosfatasa alcalina. Esto nos indica que Tpx2 lleva a cabo una función durante interfase que es independiente de su papel como regulador de la quinasa Aurora A. Hemos visto que los hígados dañados de los ratones *Tpx2*(Δ/Δ) presentan un aumento significativo en el porcentaje de células positivas para Ki67, este resultado es consistente con el aumento en la expresión de RNA mensajero de Tpx2. Hemos demostrado que las células que entran en el ciclo son aquellas situadas en la periferia de las zonas dañadas, lo cual sugiere que los hepatocitos entran en ciclo para poder regenerar la zona dañada (Michalopoulos, 2007).

Teniendo en cuenta que la eliminación de Tpx2 no es total en el hígado y, muy especialmente, el hecho de que la respuesta al tratamiento sea tan rápida, puede estar indicando que hay otro órgano diana, distinto del hígado, que desencadena una serie de efectos que culminan con un fallo hepático agudo. Si seguimos esta hipótesis y teniendo en cuenta la rapidez de la aparición del fenotipo, cabe pensar que la señal de daño se transmite muy rápidamente en el organismo. Por ello, podemos especular que el primer órgano diana sea una glándula y que las alteraciones en los niveles de hormonas y metabolitos que esto provoca serían el inicio de las alteraciones en la fisiología de los ratones *Tpx2*(Δ/Δ).

Para comprender este inesperado fenotipo será necesaria una batería de experimentos, cuya realización no ha sido posible aún, que nos permitan encontrar el primer órgano diana de la pérdida de Tpx2. Será igualmente necesario analizar los niveles de Tpx2 en todos los tejidos posibles y encontrar aquello en los que la pérdida de expresión sea más aguda. Del mismo modo, tenemos planeado analizar por resonancia magnética nuclear los niveles de aminoácidos y otros metabolitos en el suero de dos cohortes de ratones *Tpx2*(+/+) y *Tpx2*(Δ/Δ). Así como analizar los niveles de varias hormonas en sangre (insulina, leptina, hormonas tiroideas y adiponectina) que nos permitan encontrar la raíz del fenotipo de los animales *Tpx2*(Δ/Δ).

Quedan muchas preguntas por responder a cerca de la función que Tpx2 pueda estar ejerciendo en el metabolismo y este modelo condicional para Tpx2 que hemos generado será una herramienta crucial. Durante los próximos años, los experimentos comentados y otros que surjan derivados de los mismos permitirán terminar de comprender cómo la ausencia de Tpx2 provoca la muerte de ratones adultos sin afectar a una gran mayoría de sus células o tejidos.

4.1 Tpx2, ¿nuevo regulador del transporte de moléculas del citoplasma al núcleo?

Hemos podido demostrar que la falta de expresión de Tpx2 resulta en un déficit de la activación de Akt y, en consecuencia, de la captación de glucosa. La activación de esta ruta

depende de la unión de la insulina a su receptor en la membrana plasmática. Cuando esto sucede, las subunidades beta del receptor se fosforilan y comienza la activación de los efectores de la ruta, en paralelo con la internalización y reciclaje del receptor (Saltiel and Kahn, 2001; Di Guglielmo et al., 1998; Podlecki et al., 1987). Las consecuencias a largo plazo de la unión de la insulina resultan en un aumento del crecimiento celular y en la activación de la expresión de genes implicados en metabolismo. El mecanismo mediante el cual la dinámica del receptor y su redistribución en la célula regula el transporte y metabolismo de glucosa, lípidos y proteínas no se conoce aún con exactitud. Su activación se lleva a cabo por dos vías distintas: (i) la unión de la insulina provoca la fosforilación del sustrato IRS1 y la interacción de proteínas con dominios SH2, como por ejemplo la fosfatidil inositol 3 quinasa. Finalmente, la activación de Akt promueve la translocación de los transportadores de glucosa a la membrana plasmática y permite un aumento de la captación de glucosa (Ng et al. 2002); (ii) el segundo mecanismo conlleva la internalización al núcleo del receptor de insulina y de otros miembros de la ruta de tal forma que tiene lugar una activación directa de la transcripción (Podlecki et al., 1987; Smith and Jarett, 1987). Esta internalización se ha podido visualizar *in vivo* en hepatocitos tras la estimulación con insulina (Gletsu et al., 1999). La translocación del receptor provoca la fosforilación de tirosinas de varias proteínas nucleares (Kim and Kahn, 1993). Del mismo modo, varios estudios han demostrado que IRS1 también cumple una función en el núcleo de células de rata (Boylan and Gruppuso, 2002). La insulina provoca también la internalización de otros miembros de esta vía como son la PI3K, que en el interior del núcleo es capaz de interaccionar con IRS-1 nuclear (Kim et al. 1998); el IRS-1 y la forma fosforilada de Akt o ERK que pueden activar, así, de forma directa la transcripción (Nguyen and D'Haeseleer, 2006; Furuno et al., 2001; Kabuta et al., 2002). Si bien en los últimos años se han hecho muchos avances en el entendimiento de los mecanismos reguladores de estas rutas de transducción de señales, existen todavía muchas cuestiones sin resolver a cerca de la función que estos reguladores llevan a cabo en el interior del núcleo.

Tpx2 localiza en el núcleo durante interfase y, como ya hemos mencionado anteriormente, la base de datos del Consorcio Europeo MitoCheck presenta a TPR y MAD2

como proteínas que interaccionan con TPX2 en células humanas. TPR interacciona directamente con MAD1 y MAD2 en los poros nucleares de células humanas, de hecho, la interferencia de TPR por RNAi previene la localización de ambas proteínas en los poros nucleares durante interfase e impide la transición de metafase a anafase (Lee et al., 2008). Contamos con resultados preliminares, obtenidos a partir de co-inmunoprecipitaciones, que confirman la interacción de Tpr y Tpx2 en fibroblastos embrionarios de ratón (Figura 59 A). Podemos conectar estos resultados con el hecho de que la eliminación genética de Tpx2 *in vitro* provoca un déficit en la internalización de moléculas en el núcleo. Gracias al análisis de la internalización del receptor de estrógenos tras la inducción con 4-hidroxi tamoxifeno, hemos demostrado que Tpx2 juega un papel en el tráfico de moléculas del citoplasma al núcleo. Nuestra hipótesis, por tanto, es que Tpx2 localiza en los poros nucleares y regula el transporte de moléculas al interior del núcleo (Figuras 59 B y 60).

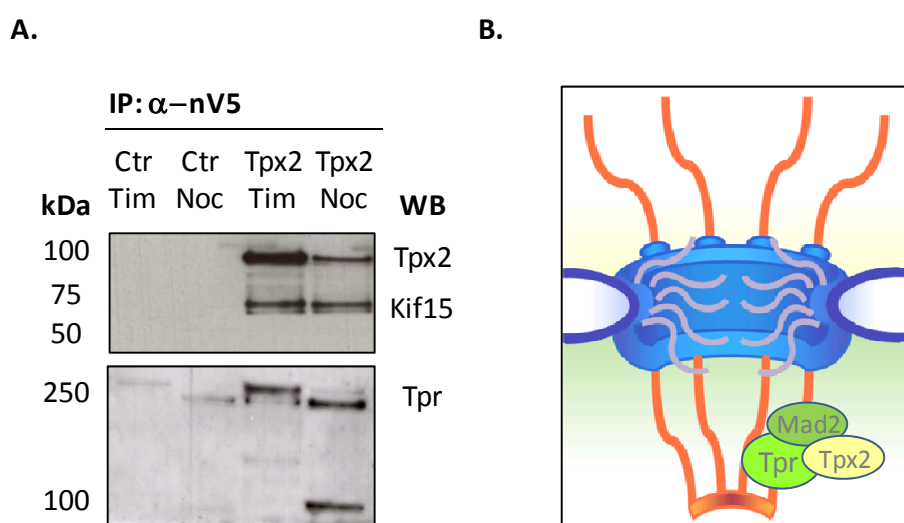
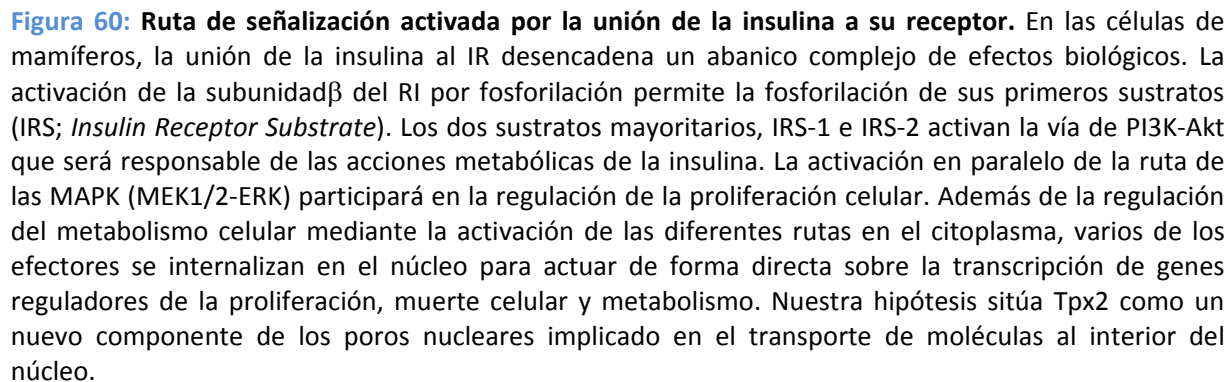


Figura 59: Asociación de Tpx2 con los poros nucleares. (A) Ensayo de inmunoprecipitación en células humanas HEK293 que expresan la forma salvaje de Tpx2 fusionado al polipéptido V5. Las células fueron sincronizadas con timidina ("Tim" células en fase S) y con nocodazol ("Noc"; células en mitosis). Kif15 fue utilizado como control positivo de la inmunoprecipitación. Para precipitar Tpx2 se utilizó un anticuerpo contra V5 y en el western blot detectamos Kif15, Tpx2 y Tpr. (B) Posible localización de Tpx2 en los poros. Tpx2 formaría un complejo proteico con Mad2 y la nucleoproteína Tpr en los filamentos nucleares que unen el anillo distal (naranja) con el anillo nuclear.

Todavía no conocemos el mecanismo mediante el cual Tpx2 podría regular la internalización de moléculas. En primer lugar, debemos confirmar su localización en los poros nucleares mediante microscopía electrónica. Es necesario también dilucidar si Tpr, Mad2 y Tpx2 forman un complejo en estas estructuras de la envoltura nuclear; mediante eliminaciones seriadas de cada uno de las tres proteínas podremos entender qué relación mantienen éstas en el complejo. En el caso de Tpr y Mad2 se ha demostrado que la pérdida de Tpr provoca la deslocalización de Mad2, sin embargo, la eliminación de Mad2 no afecta la localización de Tpr (Lee et al., 2008). Tpr actuaría, por tanto, como anclaje entre Mad2 y los poros nucleares.

Uno de los resultados más interesantes de este trabajo ha sido la demostración de que Tpx2 juega un papel clave en la transcripción de genes claves en la integración de señales extracelulares como son fos, jun y Sre-1 (elemento de respuesta al suero; del inglés *serum response element*). Es muy posible que esta característica de Tpx2 esté íntimamente asociada a su papel en la internalización de moléculas al interior del núcleo. Quedan, sin embargo, muchas cuestiones por resolver a cerca de la posible función de Tpx2 como regulador del transporte de moléculas a través de la envoltura nuclear y, en último término, como agente integrador/adaptador de señales externas.



5. Tpx2 y cáncer

Tpx2, no sólo aparece aumentado en varios cánceres humanos (Tabla 1) si no que su sobreexpresión presenta una correlación positiva con la estadio de desarrollo de estos tumores, la presencia de linfometástasis y el pronóstico grave de la enfermedad (Ma et al, 2006; Shigeishi et al. 2009; Li et al. 2009). Además, es el gen cuya sobreexpresión presenta una mayor correlación con la presencia de inestabilidad cromosómica en tumores humanos (Carter et al., 2006). El trabajo con modelos animales haploinsuficientes para otros reguladores mitóticos como Aurora A, CenpE, Mad2 o Cdh1, ha permitido establecer una correlación entre la disminución de los niveles de expresión de estas proteínas y el desarrollo de tumores. Pero, no sólo la disminución de la expresión de reguladores mitóticos se ha asociado con cáncer, si no que el aumento de expresión de esos mismos genes puede dar como resultado la aparición de tumores, generalmente a través de un aumento en las aneuploidías (Schvartzman et al. 2010). Este es el caso de los genes Mad2 o Aurora A que aparecen sobreexpresadas en varios tipos de cánceres humanos y que en el caso de perder una de sus dos copias (haploinsuficiencia) están asociados al desarrollo de carcinomas pulmonares y linfomas en ratones (Lu et al., 2008; Michel et al., 2001; Sotillo et al., 2007).

En este trabajo hemos demostrado que los ratones haploinsuficientes para Tpx2 acumulan aneuploidías con la edad y que sus tejidos son genéticamente inestables. Esta característica tiene correlación con un aumento en la susceptibilidad del desarrollo de tumores, apoyando la idea de que la pérdida de regulación de Tpx2 puede, finalmente, actuar como motor tumoral mediante la inducción de aneuploidías. Hemos demostrado que la eliminación genética de Tpx2 resulta en alteraciones en la segregación de cromosomas, dando lugar a células tetraploides y aneuploides. Además, los ratones heterocigóticos para Tpx2 son propensos a un amplio espectro de tumores, lo cual sugiere que esta proteína puede tener un papel como supresor tumoral protegiendo la estabilidad del genoma.

Cabe destacar que la incidencia de tumores en ratones *Tpx2*(+/-) es del 53% mientras que para ratones *AurkA*(+/-), este porcentaje es del 25,5% (Lu et al. 2008). En ambos casos los

tumores más comunes fueron linfomas y adenocarcinomas de pulmón. El hecho de que se desarrollen el mismo tipo de tumores, hace pensar que los tumores encontrados en los ratones *Tpx2*(+/-) sean consecuencia de su papel como regulador de la quinasa Aurora A. *Tpx2* es el encargado de mantener la actividad quinasa de Aurora A, por tanto, una disminución en los niveles de la primera tendría como resultado la disminución en la actividad de la quinasa. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que el fenotipo maligno inducido por *Tpx2* sea independiente de Aurora-A y que las características comunes que hemos encontrado sean consecuencia de una susceptibilidad similar del pulmón y sistema hematopoyético a la tumorigénesis asociada a inestabilidad cromosómica.

Por otro lado, el hecho de que la incidencia de tumores en ratones sea doble en los ratones *Tpx2*(+/-) que en los *AurKA*(+/-) nos puede estar indicando que las funciones metabólicas que *Tpx2* parece realizar independientemente de la quinasa podrían ser las responsables de ese aumento en el porcentaje de tumores. Cabe destacar también que, mientras *Tpx2* es el primero en la lista de genes cuya sobreexpresión se ha asociado a la presencia de CIN y el pronóstico grave de tumores, Aurora A ocupa el puesto 67 (Carter et al., 2006). Este hecho apoya, de nuevo, la hipótesis de que *Tpx2* lleva a cabo funciones independientes de la regulación de Aurora A y que las alteraciones en estas funciones agravan las consecuencias que las alteraciones de la quinasa tendrían *per se*.

Hemos demostrado que, además de los tumores ya publicados (Tabla 1), *Tpx2* se encuentra sobreexpresado en linfomas tipo Hodgkin, en cáncer de mama y en mielomas. No podemos descartar que la sobreexpresión del complejo *Tpx2*/Aurora A, y no sólo de *Tpx2*, sea la responsable del desarrollo de estos tumores. La sobreexpresión de *Tpx2* puede provocar un aumento en la actividad y estabilidad de Aurora A, mimetizando la situación descrita para la sobreexpresión de la quinasa. Es importante destacar que para varios tipos de tumores humanos existe una correlación entre la sobreexpresión de Aurora A y *Tpx2*. Este es el caso del cáncer de cuello y cabeza, pulmón, cáncer gastro-intestinal, hígado, riñón, ovario, vejiga, próstata y sarcoma (Asteriti et al. 2010). Es por ello que se ha presentado al complejo Aurora A/*Tpx2* como una posible holoenzima con capacidades oncogénicas, sugiriéndose que algunos

de los papeles atribuidos a Aurora A en la transformación celular y tumorigénesis podrían tener su origen en la activación oncogénica del complejo (Asteriti et al., 2010).

Estos resultados que mostramos en relación a los efectos de la sobreexpresión y la disminución en los niveles de Tpx2, apoyan la idea ya demostrada con otros reguladores: cambios sutiles en los niveles de expresión del mismo regulador, en una dirección u otra, puede tener consecuencias importantes en la inestabilidad genómica y el cáncer.

5.1. La Inestabilidad cromosómica como motor del desarrollo tumoral en ratones *Tpx2*(+/-)

En 1914, Theodor Boveri postuló que las anomalías en la segregación de cromosomas podían promover el desarrollo de tumores. El papel causal de las alteraciones estructurales en los cromosomas y el desarrollo de tumores mediante la activación de oncogenes o la inactivación de supresores de tumores es clara (Mitelman et al., 2007). Sin embargo, existe controversia en cuanto al papel de las alteraciones numéricas.

Aun así, existen cada más evidencias que apoyan la hipótesis de que la CIN actúa como motor tumorigénico (revisado en Schwartzman et al., 2010; Gordon et al., 2012). Existen tres argumentos básicos que apoyarían esta hipótesis: ensayos de transformación *in vitro* con genes como Securina o Aurora A han demostrado que las alteraciones genéticas que producen CIN tienen una asociación causal directa con la transformación maligna de las células (Pei and Melmed, 1997; Katayama et al., 2003; Zhang et al., 2004). En segundo lugar, el trabajo con modelos animales ha permitido establecer una conexión causal clara entre CIN y el desarrollo de tumores (revisado en Perez de Castro et al., 2008; Schwartzman et al., 2010). Este ha sido el caso de Mad2 o RanBP2, ambas proteínas implicadas en el transporte de moléculas durante interfase (Lee et al., 2008; Dawlaty et al., 2008) o Securina, Bub1 y BubR1 (Bernal et al., 2002; Fang et al., 2006; Hein et al., 2006). En tercer lugar, gran cantidad de datos procedentes de estudios con tumores humanos sugieren que la aneuploidía tiene un rol causal en

tumorigénesis (Carter et al. 2006). Los resultados que hemos obtenido en este trabajo suponen otro argumento adicional a favor de esta hipótesis.

Hemos podido demostrar que, tanto *in vivo* como *in vitro*, la desregulación de los niveles de Tpx2 puede dar lugar a inestabilidad genómica. La sobreexpresión de Tpx2 en células que sobreexpresan HRasV12 provoca una acumulación de inestabilidad cromosómica que no aparece en las células que únicamente sobre-expresan el oncogén. Por otro lado, los ratones heterocigóticos para Tpx2 presentan aneuploidías en el bazo que se agravan con el paso del tiempo y que, finalmente, se asocian al desarrollo de tumores.

Podemos concluir que tanto el aumento como la disminución en los niveles de Tpx2 provocan inestabilidad cromosómica y que ésta actúa como motor en el desarrollo tumoral y en la transformación maligna de las células.

5.2. Papel de Tpx2 en la transducción de señales y su posible implicación en cáncer

El fenotipo de daño hepático que encontramos en los ratones adultos tras la eliminación genética de Tpx2 nos permitió explorar nuevas posibles funciones de esta proteína más allá de la regulación de la progresión del ciclo celular.

Los MEFs *Tpx2*(Δ/Δ) presentan un defecto severo en la captación de glucosa. La quinasa serina/treonina PKB/Akt juega un papel crucial en la captación de glucosa por parte de las células. Una vez fosforilada como resultado de la activación de la ruta de la insulina, Akt promueve la translocación de los transportadores de glucosa GLUT 1 y GLUT4 desde los compartimentos vesiculares intracelulares, a la membrana plasmática, activando así la captación de glucosa (Saltiel and Kahn, 2001; Bae et al., 2003; Ng et al. 2002). Hemos podido observar, además, que la pérdida de expresión de Tpx2 impide la activación total de Akt tras estimulación con suero.

Akt está implicado en muchos procesos celulares a través de la activación de distintos efectores y su desregulación está asociada a enfermedades como diabetes, cáncer o

enfermedades cardiovasculares y neurológicas (Figura 61) (revisado en Hers et al., 2011). En relación al cáncer, la de PI3K es una de las rutas que aparece con más frecuencia mutada en cáncer humano, de hecho, en los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo en el desarrollo de pan-inhibidores o inhibidores específicos de esta ruta (Yuan and Cantley, 2008). Es sorprendente que todos y cada uno de los miembros de esta vía se hayan encontrado alterados en cánceres humanos. Para el caso de Akt, ésta aparece amplificada en cáncer de páncreas, ovario, cuello y cabeza (Engelman et al., 2006). Se ha encontrado mutado en cáncer de mama, ovario y cáncer colorectal. Además, su activación prolongada es suficiente para provocar la transformación maligna de las células (Carpten et al., 2007; Tibes et al., 2008).

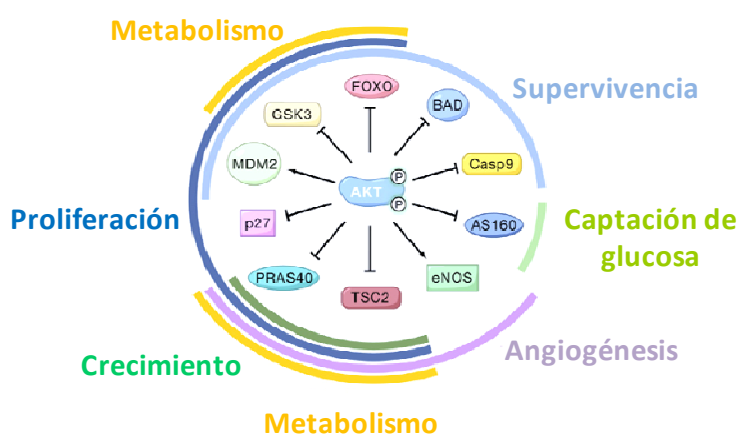


Figura 61: Funciones de Akt. Se muestran las funciones de 10 de los sustratos de Akt. La fosforilación por Akt activará (flechas) o inhibirá (flechas bloqueadas) la actividad de sus sustratos. Esta regulación da lugar a la activación de los procesos biológicos que se muestran en el esquema (adaptado de Manning and Cantley, 2007).

Teniendo en cuenta estas premisas, podemos plantear una hipótesis en la que la CIN encontrada en tumores que sobre-expresan Tpx2, podría tener su origen, no sólo en el papel de esta proteína en la regulación del ciclo, si no en las alteraciones en la ruta metabólica de la PI3K. La sobreexpresión de Tpx2 podría provocar una activación descontrolada de Akt en el núcleo. Mdm2, un conocido sustrato de AKT (Mayo and Donner, 2001), es una ubiquitina ligasa E3 que juega un papel esencial en la estabilidad de p53 (Haupt et al., 1997). La sobreexpresión de Tpx2 podría ser responsable de una hiperactivación de Akt, que activaría Mdm2. Esta ligasa, marcaría a p53 para la degradación mediante ubiquitinación y así la degradación de p53

actuaría como mecanismo evasivo de apoptosis, dando lugar a una proliferación descontrolada asociada con el desarrollo tumoral.

Hemos visto que Tpx2 juega un papel en la activación de Akt tras la estimulación con suero. AKT necesita estar fosforilada para mantener su localización nuclear (Nguyen et al., 2006) y podemos plantear dos mecanismos mediante los cuales Tpx2 podría regular la activación de Akt. Teniendo en cuenta la localización nuclear de Tpx2 y las predicciones de interacción con Mad2 y Tpr, pudiera ser que Tpx2 localizada en los poros nucleares, fuera responsable de la internalización de Akt, una vez activada por la PI3K. Otro mecanismo podría ser aquel en el que Tpx2, localizado en el nucleoplasma, interaccionaría con Akt en el núcleo, protegiéndole de la desfosforilación en una regulación similar a la que lleva a cabo con Aurora A. En ambos casos, la ausencia de Tpx2 conllevaría una disminución de la activación de la ruta, así como una disminución en la localización de Akt en el núcleo como hemos visto en las células *Tpx2*(Δ/Δ) estimuladas con suero. La inactivación de la ruta de Akt explicaría el déficit que presentan las células *Tpx2*(Δ/Δ) en la captación de glucosa.

Mad2 es uno de los genes cuya expresión se ha relacionado con el desarrollo de tumores humanos (Pérez de Castro et al., 2008). Aparece sobreexpresado en varios tipos de tumores y, al igual que sucede con la sobreexpresión de Tpx2, induce inestabilidad cromosómica en células (Michel et al., 2004) y en ratones (Sotillo et al., 2007). Se ha demostrado que no es necesaria la sobreexpresión de Mad2 de forma continuada para mantener el crecimiento del tumor (Sotillo et al., 2007). Es decir, la inestabilidad genómica producida por Mad2 actuaría como motor del desarrollo del tumor y a medida que el tumor se desarrolla, las alteraciones cromosómicas que provoca se harían independientes del mantenimiento de su expresión. Este hecho es consistente con la consideración teórica que sugiere que una vez la célula adquiere CIN, mantiene una frecuencia de pérdida de cromosomas que maximizará la pérdida de genes supresores de tumores y favorecerá la expansión de clones transformados (Komarova, 2004).

Para dilucidar hasta qué punto la inestabilidad cromosómica o las alteraciones en el metabolismo son el motor de los tumores resultantes de la sobreexpresión de Tpx2, sería necesaria la generación de un modelo inducible de ratón que nos permitiera sobreexpresar Tpx2 hasta dar lugar a un tumor y luego poder recuperar los niveles endógenos de la proteína.

Si la hiperactivación de la ruta PI3K es la raíz del desarrollo tumoral, la pérdida de expresión de Tpx2 provocaría la regresión del tumor. Sin embargo, si es la CIN la responsable del desarrollo tumoral éste mantendría su crecimiento incluso en ausencia de Tpx2.

6. La importancia de controlar los niveles de expresión de Tpx2

Pequeños cambios, suficientes para no afectar la viabilidad de la célula, en la expresión de determinados genes pueden provocar la pérdida de la regulación de la mitosis e inducir inestabilidad genómica. Éste es el caso de Tpx2, en el que tanto la sobreexpresión como la disminución de sus niveles dan lugar al desarrollo de tumores en los que la CIN es una característica común. Es importante destacar el hecho de que la sobreexpresión de Tpx2 *per se* no fue suficiente para inducir la transformación maligna de las células R24C y que, en presencia del oncogén HRasV12, la formación de focos se ve reducida. Nuestra hipótesis a cerca de este hecho sería que la sobreexpresión de Tpx2 provoca niveles tales de inestabilidad cromosómica que comprometen la viabilidad de las células. Aquellos focos que todavía se forman en presencia de ambos genes corresponderían con aquellos que sobreexpresan niveles de Tpx2 tolerables para la célula.

Esto demostraría la susceptibilidad de las células a una sobreexpresión excesiva de Tpx2. El trabajo con los ratones heterocigóticos nos ha demostrado que la reducción del 50% (aproximadamente) de los niveles de Tpx2, si bien provoca inestabilidad en los tejidos y da lugar a tumores de larga latencia, no es incompatible con la vida del animal. Sin embargo, la pérdida de los dos alelos de Tpx2 provoca un daño hepático agudo tal que la supervivencia del animal se ve comprometida. De la misma forma, la pérdida de los dos alelos salvajes de Tpx2 en MEFs provoca alteraciones en la progresión del ciclo y en la segregación de cromosomas, sin embargo, los MEFs *Tpx2*(+/-) no presentaron diferencias significativas con las células salvajes en cuanto a la duración de mitosis o las aberraciones estructurales presentes en los husos. Todos estos resultados demuestran cuán importante es mantener una regulación precisa de los niveles de Tpx2 (Figura 62).

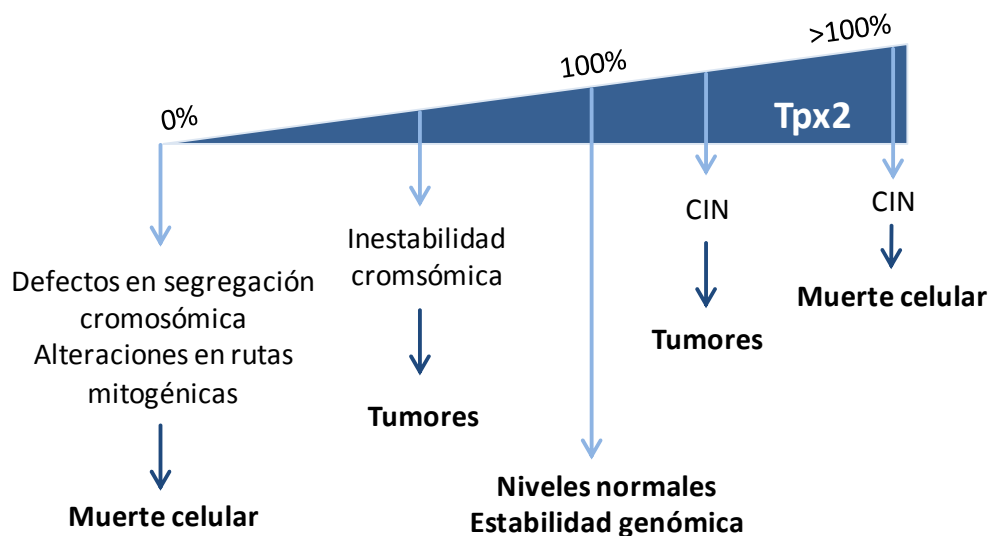


Figura 62: Consecuencias de las alteraciones en los niveles de expresión de Tpx2.

Este proyecto de tesis comenzó con una pregunta biológica básica ¿qué papel cumple Tpx2 en la progresión del ciclo celular? El trabajo con el modelo condicional de Tpx2 nos ha permitido profundizar en el entendimiento de esta función. Nos ha permitido, también, encontrar una función inesperada de esta proteína hasta ahora implicada únicamente en la regulación de la mitosis: Tpx2 cumple una función en la integración de señales extracelulares y en la regulación del metabolismo. En definitiva, hemos podido demostrar el papel de Tpx2 como guardián de la integridad cromosómica y descubrir su inesperado papel en la regulación de la transducción de señales (Figura 63).

Igual que comenzamos, este trabajo termina con una batería de preguntas biológicas que abren nuevas posibilidades: ¿qué papel cumple Tpx2 en el transporte de moléculas hacia el núcleo? ¿Cuál es la aportación de esta función al desarrollo tumoral inducido por la sobreexpresión de Tpx2? ¿Cuántas de estas nuevas funciones son dependientes de Aurora A? ¿Cuál es el mecanismo por el cual se produce un daño hepático severo en animales deficientes en la expresión de Tpx2? ¿En qué órgano está teniendo lugar el defecto causante de este fenotipo? La labor investigadora de los próximos años contestará a muchas de estas preguntas y dará lugar a otro buen número de incógnitas.

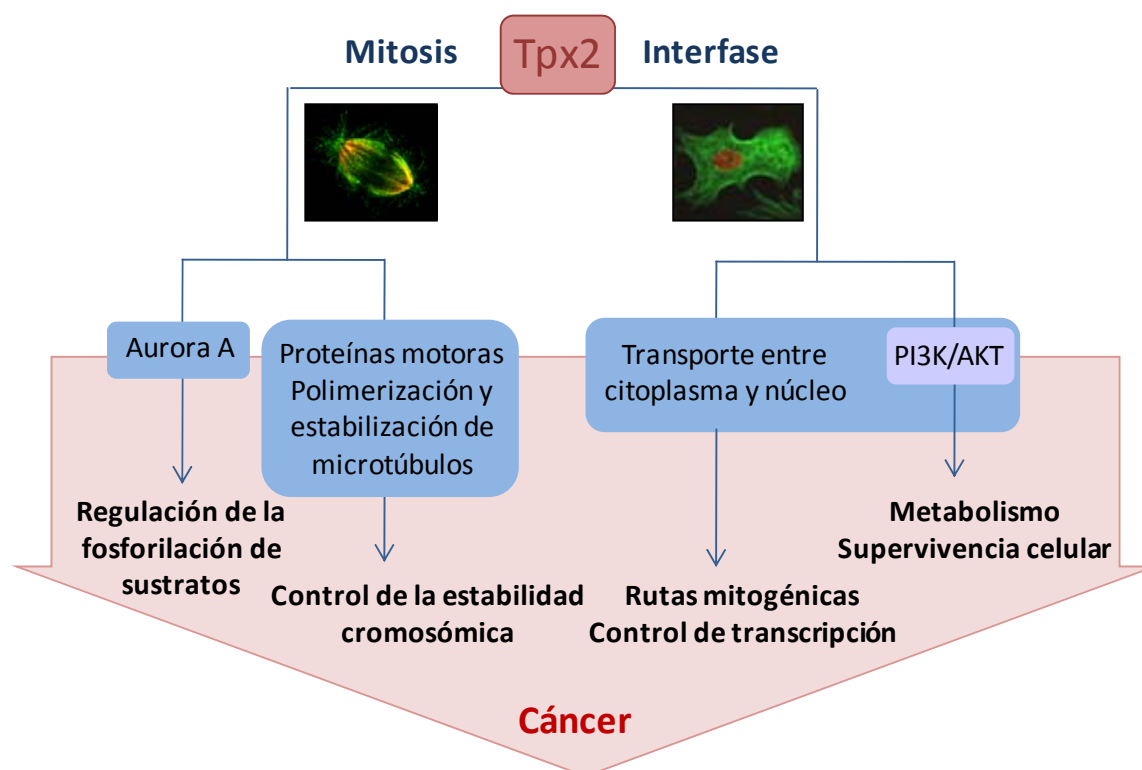


Figura 63: Funciones de Tpx2. Durante mitosis, Tpx2 regula la activación de la quinasa Aurora A así como la actividad y localización de otras proteínas motoras asociadas al huso mitótico. La desregulación de Tpx2 puede provocar alteraciones en el estado de activación de los sustratos de Aurora A, dar lugar a errores en la división celular y, finalmente, a la transformación maligna de las células. Del mismo modo, mediante la regulación de la polimerización y estabilidad de microtúbulos Tpx2 regula la fidelidad de la división y la estabilidad cromosómica. En interfase, Tpx2 localiza en el núcleo y podría estar implicada en el transporte de moléculas entre el citoplasma y el núcleo. Una de las rutas que regula a través de este mecanismo es la vía de la PI3K/AKT. Alteraciones en la regulación de esta ruta pueden dar lugar a alteraciones en el metabolismo y la supervivencia celular, procesos que pueden tener como consecuencia final el desarrollo de tumores.

CONCLUSIONES

1. Tpx2 es un gen esencial en el desarrollo embrionario de mamíferos. La pérdida de expresión de Tpx2 provoca letalidad embrionaria temprana que es consecuencia de alteraciones en la formación del huso mitótico.
2. Los ratones heterocigóticos para Tpx2 presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores espontáneos. Los tejidos *Tpx2*(+/-) acumulan aneuploidías durante el desarrollo. Estas aneuploidías podrían estar actuando como motor tumorigénico.
3. Tpx2 es esencial durante la vida adulta de mamíferos. La pérdida total de expresión de esta proteína provoca un fallo hepático agudo que supone la muerte temprana del ratón.
4. Tpx2 juega un papel crucial en la progresión del ciclo celular y en la segregación equitativa del material genético. Las células *Tpx2*(Δ/Δ) sufren una parada en mitosis que es dependiente del punto de control mitótico (SAC). Finalmente, salen de mitosis como una única célula poliploide.
5. La parada en mitosis de los MEFs *Tpx2*(Δ/Δ) se debe a un déficit agudo en la polimerización de microtúbulos dependiente de la cromatina. Esta alteración tiene como consecuencia el establecimiento de husos mitóticos aberrantes que comprometen la fidelidad de la división celular.
6. Tpx2 presenta localización nuclear en interfase y juega un papel en el transporte de moléculas del citoplasma al núcleo.
7. La pérdida de expresión de Tpx2 en células primarias de ratón provoca alteraciones en la activación de la ruta de la PI3K y tiene como consecuencia final una disminución de la transcripción de genes implicados en la integración de señales mitogénicas externas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bird, A.W., and A.A. Hyman. 2008. Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *J Cell Biol.* 182:289-300.
- Adams, J.A. 2003. Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry.* 42:601–607.
- Asteriti, I.A., W.M. Rensen, C. Lindon, P. Lavia, and G. Guarguaglini. 2010. The Aurora-A/TPX2 complex: a novel oncogenic holoenzyme? *Biochim Biophys Acta.* 1806:230-239.
- Bae, S.S., H. Cho, J. Mu, and M.J. Birnbaum. 2003. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *The Journal of biological chemistry.* 278:49530-49536.
- Bailyes, E.M., B.T. Nave, M.A. Soos, S.R. Orr, A.C. Hayward, and K. Siddle. 1997. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J.* 327 (Pt 1):209-215.
- Baltzer, F. 1964. Theodor Boveri. *Science.* 144:809-815.
- Bayliss, R., T. Sardon, I. Vernos, and E. Conti. 2003. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell.* 12:851-862.
- Bernal, J.A., R. Luna, A. Espina, I. Lazaro, F. Ramos-Morales, F. Romero, C. Arias, A. Silva, M. Tortolero, and J.A. Pintor-Toro. 2002. Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nature genetics.* 32:306-311.
- Berridge, M.S. 2009. The importance of kinetic enhancement. *J Nucl Med.* 50:1203-1204.
- Bodart, J.F. 2010. Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues. *J Cell Biochem.* 109:850-857.
- Bonatz, G., J. Luttes, J. Hedderich, D. Inform, W. Jonat, P. Rudolph, and R. Parwaresch. 1999. Prognostic significance of a novel proliferation marker, anti-repp 86, for endometrial carcinoma: a multivariate study. *Hum Pathol.* 30:949-956.
- Boylan, J.M., and P.A. Gruppuso. 2002. Insulin receptor substrate-1 is present in hepatocyte nuclei from intact rats. *Endocrinology.* 143:4178-4183.

- Brunet, S. T., Sardon , T. Zimmerman , T. Wittmann, R. Pepperkok, E. Karsenti, and I. Vernos. 2004. Characterization of the TPX2 domains involved in microtubule nucleation and spindle assembly in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Biol. Cell.* 15: 5318–5328.
- Carazo-Salas, R.E., O.J. Gruss, I.W. Mattaj, and E. Karsenti. 2001. Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nat Cell Biol.* 3:228-234.
- Carmena M, Earnshaw WC (2003) The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 842–854.
- Carpten, J.D., A.L. Faber, C. Horn, G.P. Donoho, S.L. Briggs, C.M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T.Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y.W. Qian, D.J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S. Mousses, M. Bittner, R. Schevitz, M.H. Lai, K.L. Blanchard, and J.E. Thomas. 2007. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.* 448:439-444.
- Carter, S.L., A.C. Eklund, I.S. Kohane, L.N. Harris, and Z. Szallasi. 2006. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet.* 38:1043-1048.
- Carvalho-Santos, Z., J. Azimzadeh, J.B. Pereira-Leal, and M. Bettencourt-Dias. Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *J Cell Biol.* 194:165-175.
- Cassimeris, L. 1999. Accessory protein regulation of microtubule dynamics.
- Caudron, M., G. Bunt, P. Bastiaens, and E. Karsenti. 2005. Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science.* 309:1373-1376.
- Chauvière M, Kress C, Kress M. 2008 *Biochem Biophys Res Commun.* Disruption of the mitotic kinesin Eg5 gene (*Knsl1*) results in early embryonic lethality. Aug 8;372(4):513-9. Epub 2008 May 12.
- Cheatham, B., and C.R. Kahn. 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocrine reviews.* 16:117-142.
- Cheng, E., C.W. Young, and R.E. Wittes. 1980. Phase II trial of vindesine in advanced head and neck cancer. *Cancer Treat Rep.* 64:1141-1142.
- Ciciarello, M., R. Mangiacasale , and P. Lavia .2007. Spatial control of mitosis by the GTPase Ran. *Cell. Mol. Life Sci.*64: 1891–1914.
- Clarke, P.R., and C. Zhang. 2008. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jun;9(6):464-77

- Cowley, D.O., J.A. Rivera-Pérez, M. Schliekelman, Y.J. He, T.G. Oliver, L. Lu, R. O'Quinn, E.D. Salmon, T. Magnuson, and T. Van Dyke. 2009. Aurora-A kinase is essential for bipolar spindle formation and early development. *Mol. Cell. Biol.* 29:1059–1071.
- Crosio, C., G.M. Fimia, R. Loury, M. Kimura, Y. Okano, H. Zhou, S. Sen, C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi. 2002. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol.* 22:874-885.
- Dawlaty, M.M., L. Malureanu, K.B. Jeganathan, E. Kao, C. Sustmann, S. Tahk, K. Shuai, R. Grosschedl, and J.M. van Deursen. 2008. Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha. *Cell.* 133:103-115.
- De Cárcer G, Manning G, Malumbres M. From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle.* 2011. 10: 2255-2262
- Desai, A., and T.J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:83–117.
- Di Guglielmo, G.M., P.G. Drake, P.C. Baass, F. Authier, B.I. Posner, and J.J. Bergeron. 1998. Insulin receptor internalization and signalling. *Mol Cell Biochem.* 182:59-63.
- Ebina, Y., L. Ellis, K. Jarnagin, M. Edery, L. Graf, E. Clauser, J.H. Ou, F. Masiarz, Y.W. Kan, I.D. Goldfine, and et al. 1985. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell.* 40:747-758.
- Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics.* 7:606-619.
- Evans, T., E.T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, and T. Hunt. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 33:389-396.
- Evrard, J.L., L. Pieuchot, J.W. Vos, I. Vernos, and A.C. Schmit. 2009. Plant TPX2 and related proteins. *Plant Signal Behav.* 4:69-72.
- Eysers, P.A., and J.L. Maller. 2003. Regulating the regulators: Aurora A activation and mitosis. *Cell Cycle.* 2:287-289.
- Fang, Y., T. Liu, X. Wang, Y.M. Yang, H. Deng, J. Kunicki, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, L. Lu, and W. Dai. 2006. BubR1 is involved in regulation of DNA damage responses. *Oncogene.* 25:3598-3605.

- Faragher, A.J., and A.M. Fry. 2003. Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles. *Mol. Biol. Cell.* 14:2876–2889.
- Fernandez-Miranda G, de Castro IP, Carmena M, Aguirre-Portoles C, Ruchaud S, Fant X, Montoya G, Earnshaw WC, Malumbres M. 2010. SUMOylation modulates the function of Aurora-B kinase. *J Cell Sci* 123: 2823–2833
- Flemming W. 1882. *Zellsubstanz, kern und Zellheinelung.*
- Friedrich, G., and P. Soriano. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* 5:1513-1523.
- Furuno, T., N. Hirashima, S. Onizawa, N. Sagiya, and M. Nakanishi. 2001. Nuclear shuttling of mitogen-activated protein (MAP) kinase (extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2) was dynamically controlled by MAP/ERK kinase after antigen stimulation in RBL-2H3 cells. *Journal of immunology.* 166:4416-4421.
- Gable, A., M. Qiu, J. Titus, S. Balchand, N.P. Ferenz, N. Ma, E.S. Collins, C. Fagerstrom, J.L. Ross, G. Yang, and P. Wadsworth. 2012. Dynamic reorganization of Eg5 in the mammalian spindle throughout mitosis requires dynein and TPX2. *Molecular biology of the cell.* 23:1254-1266.
- Gadde, S., and R. Heald. 2004. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol.* 14:R797-805.
- Garrett, S., K. Auer, D.A. Compton, and T.M. Kapoor. 2002. hTPX2 is required for normal spindle morphology and centrosome integrity during vertebrate cell division. *Curr Biol.* 12:2055-2059.
- Gletsu, N., W. Dixon, and M.T. Clandinin. 1999. Insulin receptor at the mouse hepatocyte nucleus after a glucose meal induces dephosphorylation of a 30-kDa transcription factor and a concomitant increase in malic enzyme gene expression. *J Nutr.* 129:2154-2161.
- Gold, M.G., D. Barford, and D. Komander. 2006. Lining the pockets of kinases and phosphatases.. *Biol.* 16:693–701. *Curr. Opin. Struct*
- Gordon, D.J., B. Resio, and D. Pellman. 2012. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nature reviews. Genetics.* 13:189-203.
- Goshima, G. Identification of a TPX2-like microtubule-associated protein in *Drosophila*. *PLoS One.* 6:e28120.

- Gotto, A.M., Jr., and E.H. Wittels. 1980. What's new: arguments for and against the treatment of hyperlipidemia. *Tex Med.* 76:38-42.
- Gripentrog, J.M., and H.M. Miettinen. 2005. Activation and nuclear translocation of ERK1/2 by the formyl peptide receptor is regulated by G protein and is not dependent on beta-arrestin translocation or receptor endocytosis. *Cellular signalling.* 17:1300-1311.
- Gruss, O.J., and I. Vernos. 2004. The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2. *J Cell Biol.* 166:949-955.
- Gruss, O.J., M. Wittmann, H. Yokoyama, R. Pepperkok, T. Kufer, H. Sillje, E. Karsenti, I.W. Mattaj, and I. Vernos. 2002. Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nature cell biology.* 4:871-879
- Gruss, O.J., R.E. Carazo-Salas, C.A. Schatz, G. Guarguaglini, J. Kast, M. Wilm, N. Le Bot, I. Vernos, E. Karsenti, and I.W. Mattaj. 2001. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell.* 104:83-93.
- Gu, Y., J. Rosenblatt, and D.O. Morgan. 1992. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J.* 11:3995-4005.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144:646-674.
- Harbour, J.W., and D.C. Dean. 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14:2393-2409.
- Harbour, M.E., J.W. Gregory, H.R. Jenkins, and B.A. Evans. 2000. Proliferative response of different human osteoblast-like cell models to proinflammatory cytokines. *Pediatr Res.* 48:163-168.
- Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz, and M. Oren. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 387:296-299.
- Heald, R., R. Tournebise, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature.* 382:420-425
- Hein, J., S. Boichuk, J. Wu, Y. Cheng, R. Freire, P.S. Jat, T.M. Roberts, and O.V. Gjoerup. 2009. Simian virus 40 large T antigen disrupts genome integrity and activates a DNA damage response via Bub1 binding. *Journal of virology.* 83:117-127.

- Hendzel, M.J., Y. Wei, M.A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B.R. Brinkley, D.P. Bazett-Jones, and C.D. Allis. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 106:348-360.
- Hers, I., E.E. Vincent, and J.M. Tavaré. 2011. Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling*. 23:1515-1527.
- Huse, M., and J. Kuriyan. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*. 109:275–282
- Hutchins, J.R., Y. Toyoda, B. Hegemann, I. Poser, J.K. Heriche, M.M. Sykora, M. Augsburg, O. Hudecz, B.A. Buschhorn, J. Bulkescher, C. Conrad, D. Comartin, A. Schleiffer, M. Sarov, A. Pozniakovsky, M.M. Slabicki, S. Schloissnig, I. Steinmacher, M. Leuschner, A. Ssykor, S. Lawo, L. Pelletier, H. Stark, K. Nasmyth, J. Ellenberg, R. Durbin, F. Buchholz, K. Mechtler, A.A. Hyman, and J.M. Peters. 2010. Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science*. 328:593-599.
- Iouk, T., O. Kerscher, R.J. Scott, M.A. Basrai, and R.W. Wozniak. 2002. The yeast nuclear pore complex functionally interacts with components of the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*. 159:807-819.
- Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS. 2007. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer*. ; 7: 107-117
- Jacobsen, K., A. Groth, and B.M. Willumsen. 2002. Ras-inducible immortalized fibroblasts: focus formation without cell cycle deregulation. *Oncogene*. 21:3058-3067.
- Kabuta, T., F. Hakuno, T. Asano, and S. Takahashi. 2002. Insulin receptor substrate-3 functions as transcriptional activator in the nucleus. *The Journal of biological chemistry*. 277:6846-6851.
- Kalab, P., A. Pralle, E.Y. Isacoff, R. Heald, and K. Weis. 2006. Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature*. 440:697-701.
- Kalab, P., K. Weis, and R. Heald. 2002. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science*. 295:2452-2456.
- Kalab, P., R.T. Pu, and M. Dasso. 1999. The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol*. 9:481-484.

- Kanda, T., K.F. Sullivan, and G.M. Wahl. 1998. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Current biology : CB.* 8:377-385.
- Karsenti, E. 2008. Self-organization in cell biology: a brief history. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:255-262.
- Karsenti, E., J. Newport, and M. Kirschner. 1984. Respective roles of centrosomes and chromatin in the conversion of microtubule arrays from interphase to metaphase. *J Cell Biol.* 99:47s-54s.
- Katayama, H., W.R. Brinkley, and S. Sen. 2003. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer metastasis reviews.* 22:451-464.
- Khodjakov, A., L. Copenagle, M.B. Gordon, D.A. Compton, and T.M. Kapoor. 2003. Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis. *J Cell Biol.* 160:671-683.
- Khodjakov, A., R.W. Cole, B.R. Oakley, and C.L. Rieder. 2000. Centrosomeindependent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr. Biol.* 10:59–67
- Kim, J.D., K. Nanto-Salonen, J.R. Szczepankiewicz, R.G. Rosenfeld, and G.F. Glasscock. 1993. Evidence for pituitary regulation of somatic growth, insulin-like growth factors-I and -II, and their binding proteins in the fetal rat. *Pediatr Res.* 33:144-151.
- Kim, S.J. 1998. Insulin rapidly induces nuclear translocation of PI3-kinase in HepG2 cells. *Biochemistry and molecular biology international.* 46:187-196.
- Kim, S.J., and C.R. Kahn. 1993. Insulin induces rapid accumulation of insulin receptors and increases tyrosine kinase activity in the nucleus of cultured adipocytes. *Journal of cellular physiology.* 157:217-228.
- Kirschner MW, Mitchison T. 1986. Microtubule dynamics. *Nature.* Dec 18-31;324(6098):621.
- Kirschner, M. and Mitchison, T. (1986). Beyond self assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45, 329-342
- Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Habedanck R, Stierhof YD, Nigg EA. Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell.* 2007;13:190-202.
- Kollman, J.M., A. Zelter, E.G. Muller, B. Fox, L.M. Rice, T.N. Davis, and D.A. Agard. 2008. The structure of the gamma-tubulin small complex: implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation. *Mol Biol Cell.* 19:207-215.

- Komarova, N.L. 2004. Genomic instability in cancer: biological and mathematical approaches. *Cell cycle*. 3:1081-1085.
- Kops, G.J., B.A. Weaver, and D.W. Cleveland. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*. 5:773-785.
- Krams, M., H.J. Heidebrecht, B. Hero, F. Berthold, D. Harms, R. Parwaresch, and P. Rudolph. 2003. Repp86 expression and outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 21:1810-1818.
- Kufer, T.A., H.H. Sillje, R. Korner, O.J. Gruss, P. Meraldi, and E.A. Nigg. 2002. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol*. 158:617-623.
- Lee, S.H., H. Sterling, A. Burlingame, and F. McCormick. 2008. Tpr directly binds to Mad1 and Mad2 and is important for the Mad1-Mad2-mediated mitotic spindle checkpoint. *Genes Dev*. 22:2926-2931.
- Li, Y., and R. Benezra. 1996. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science*. 274:246-248.
- Lin, D.M., Y. Ma, T. Xiao, S.P. Guo, N.J. Han, K. Su, S.Z. Yi, J. Fang, S.J. Cheng, and Y.N. Gao. 2006. [TPX2 expression and its significance in squamous cell carcinoma of lung]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 35:540-544.
- Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, and R.H. Medema. 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol*. 185:193-202.
- Lu LY, Wood JL, Ye L, Minter-Dykhouse K, Saunders TL, Yu X, Chen J. 2008. Aurora A is essential for early embryonic development and tumor suppression. *J Biol Chem*. Nov 14;283(46):31785-90. Epub 2008 Sep 17.
- Luders, J., and T. Stearns. 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:161-167.
- Luo, J., N.L. Solimini, and S.J. Elledge. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 136:823-837.
- Ma, N., J. Titus, A. Gable, J.L. Ross, and P. Wadsworth. 2011a. TPX2 regulates the localization and activity of Eg5 in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol*. 195:87-98.
- Ma, N., S. Matsunaga, A. Morimoto, G. Sakashita, T. Urano, S. Uchiyama, and K. Fukui. 2011b. The nuclear scaffold protein SAF-A is required for kinetochore-microtubule attachment and contributes to the targeting of Aurora-A to mitotic spindles. *J. Cell Sci*. 124:394-404.

- Ma, Y., D. Lin, W. Sun, T. Xiao, J. Yuan, N. Han, S. Guo, X. Feng, K. Su, Y. Mao, S. Cheng, and Y. Gao. 2006. Expression of targeting protein for xklp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 12:1121-1127.
- Macara, I.G. 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 65:570-594, table of contents.
- Maiato, H., C.L. Rieder, and A. Khodjakov. 2004. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J Cell Biol.* 167:831-840.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 1:222-231.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 30:630-641.
- Manning, B.D., and L.C. Cantley. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 129:1261-1274.
- Mao, Y., D. Varma, and R. Vallee. 2010. Emerging functions of force-producing kinetochore motors. *Cell Cycle.* 9:715-719.
- Mayo, L.D., and D.B. Donner. 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98:11598-11603.
- McIntosh, J.R., W.Z. Cande, and J.A. Snyder. 1975. Structure and physiology of the mammalian mitotic spindle. *Soc Gen Physiol Ser.* 30:31-76.
- Meier, R., D.R. Alessi, P. Cron, M. Andjelkovic, and B.A. Hemmings. 1997. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β . *The Journal of biological chemistry.* 272:30491-30497.
- Meunier S, Vernos I. 2012 K-fibre minus ends are stabilized by a RanGTP-dependent mechanism essential for functional spindle assembly. *Nat Cell Biol.* 2011 Nov 13;13(12):1406-14.
- Michalopoulos GK. 2007. Liver regeneration. *J. Cell Physio.* 213(2):286-300.
- Michel, L., E. Diaz-Rodriguez, G. Narayan, E. Hernando, V.V. Murty, and R. Benezra. 2004. Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101:4459-4464.

- Michel, L.S., V. Liberal, A. Chatterjee, R. Kirchwegger, B. Pasche, W. Gerald, M. Dobles, P.K. Sorger, V.V. Murty, and R. Benezra. 2001. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*. 409:355-359.
- Mitchison T, Kirschner M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 15-21;312(5991):237-42.
- Mitchison, J.M., B. Novak, and A. Sveiczler. 1997. Size control in the cell cycle. *Cell Biol Int*. 21:461-463.
- Mitelman, F., B. Johansson, and F. Mertens. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature reviews. Cancer*. 7:233-245.
- Mohsenifar, J., M. Almassi-Aghdam, Z. Mohammad-Taheri, K. Zare, B. Jafari, M. Atri, S.H. Mortazavi, P. Azadeh, M. Bagherzadeh, E. Azargashb, and F. Rahimi. 2007. Prognostic values of proliferative markers ki-67 and repp86 in breast cancer. *Archives of Iranian medicine*. 10:27-31.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*. 374:131-134.
- Nachury, M.V., T.J. Maresca, W.C. Salmon, C.M. Waterman-Storer, R. Heald, and K. Weis. 2001. Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell*. 104:95–106.
- Nakayama, K.I., and K. Nakayama. 2006. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*. 6:369-381.
- Nasmyth, K., and C.H. Haering. 2009. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet*. 43:525-558.
- Nemergut, M.E., C.A. Mizzen, T. Stukenberg, C.D. Allis, and I.G. Macara. 2001. Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science*. 292:1540-1543.
- Ng, Y., G. Ramm, J.A. Lopez, and D.E. James. 2008. Rapid activation of Akt2 is sufficient to stimulate GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Cell Metab*. 7:348-356.
- Nguyen, D.H., and P. D'Haeseleer. 2006. Deciphering principles of transcription regulation in eukaryotic genomes. *Molecular systems biology*. 2:2006 0012.
- Niethammer, P., P. Bastiaens, and E. Karsenti. 2004. Stathmin-tubulin interaction gradients in motile and mitotic cells. *Science*. 303:1862-1866.

- Nigg EA (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2: 21–32
- Norbury, C., and P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*. 61:441-470.
- O'Brien, L.L., and C. Wiese. 2006. TPX2 is required for postmitotic nuclear assembly in cell-free *Xenopus laevis* egg extracts. *J Cell Biol*. 173:685-694.
- O'Brien, R.M., and D.K. Granner. 1991. Regulation of gene expression by insulin. *Biochem J*. 278 (Pt 3):609-619.
- Ohta T, Essner R, Ryu JH, Palazzo RE, Uetake Y, Kuriyama R. Characterization of Cep135, a novel coiled-coil centrosomal protein involved in microtubule organization in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2002;156:87-99.
- Pagano, M. 1997. Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB J*. 11:1067-1075.
- Pandini, G., R. Vigneri, A. Costantino, F. Frasca, A. Ippolito, Y. Fujita-Yamaguchi, K. Siddle, I.D. Goldfine, and A. Belfiore. 1999. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin Cancer Res*. 5:1935-1944.
- Papa, V., B. Gliozzo, G.M. Clark, W.L. McGuire, D. Moore, Y. Fujita-Yamaguchi, R. Vigneri, I.D. Goldfine, and V. Pezzino. 1993. Insulin-like growth factor-I receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. *Cancer Res*. 53:3736-3740.
- Pardee, A.B. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71:1286-1290.
- Patti, M.E., and C.R. Kahn. 1998. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 9:89-109.
- Pei, L., and S. Melmed. 1997. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Molecular endocrinology*. 11:433-441.
- Pemberton, L.F., and B.M. Paschal. 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*. 6:187-198.

- Perez de Castro, I., G. de Carcer, and M. Malumbres. 2007. A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis*. 28:899-912.
- Podlecki, D.A., R.M. Smith, M. Kao, P. Tsai, T. Huecksteadt, D. Brandenburg, R.S. Lasher, L. Jarett, and J.M. Olefsky. 1987. Nuclear translocation of the insulin receptor. A possible mediator of insulin's long term effects. *J Biol Chem*. 262:3362-3368.
- Rieder, C.L. Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Res*. 19:291-306.
- Robbins, E., and N.K. Gonatas. 1964. The Ultrastructure of a Mammalian Cell during the Mitotic Cycle. *J Cell Biol*. 21:429-463.
- Romig H, Fackelmayer FO, Renz A, Ramsperger U, Richter A. 1992 Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J*. 11(9):3431-40.
- Saltiel, A.R., and C.R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414:799-806.
- Sampson, E.J., M.A. Baird, C.A. Burtis, E.M. Smith, D.L. Witte, and D.D. Bayse. 1980. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem*. 26:816-826.
- Sarkar, A., S. Eroglu, M.G. Poirier, P. Gupta, A. Nemani, and J.F. Marko. 2002. Dynamics of chromosome compaction during mitosis. *Exp Cell Res*. 277:48-56.
- Sasai, K., J.M. Parant, M.E. Brandt, J. Carter, H.P. Adams, S.A. Stass, A.M. Killary, H. Katayama, and S. Sen. 2008. Targeted disruption of Aurora A causes abnormal mitotic spindle assembly, chromosome misalignment and embryonic lethality. *Oncogene*. 27:4122-4127
- Schwartzman, J.M., R. Sotillo, and R. Benezra. 2010. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer*. 10:102-115.
- Sebastian T, Sreeja S, Thampan RV. 2004. Import and export of nuclear proteins: focus on the nucleocytoplasmic movements of two different species of mammalian estrogen receptor. *Mol Cell Biochem*. 2004 May;260(1-2):91-102.
- Shigeishi, H., K. Ohta, M. Hiraoka, S. Fujimoto, M. Minami, K. Higashikawa, and N. Kamata. 2009. Expression of TPX2 in salivary gland carcinomas. *Oncology reports*. 21:341-344.

- Shih, I.M., W. Zhou, S.N. Goodman, C. Lengauer, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 2001. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 61:818-822.
- Sierocki, J.S., N.C. Charles, M. Schafrank, and R.E. Wittes. 1980. Carcinoma metastatic to the anterior ocular segment: response to chemotherapy. *Cancer.* 45:2521-2523.
- Silverman-Gavrila, R.V., and A. Wilde. 2006. Ran is required before metaphase for spindle assembly and chromosome alignment and after metaphase for chromosome segregation and spindle midbody organization. *Mol. Biol. Cell.* 17:2069–2080.
- Smith, L.T., J. Mayerson, N.J. Nowak, D. Suster, N. Mohammed, S. Long, H. Auer, S. Jones, C. McKeegan, G. Young, G. Bos, C. Plass, and C. Morrison. 2006. 20q11.1 amplification in giant-cell tumor of bone: Array CGH, FISH, and association with outcome. *Genes Chromosomes Cancer.* 45:957-966.
- Smith, R.M., and L. Jarett. 1987. Ultrastructural evidence for the accumulation of insulin in nuclei of intact 3T3-L1 adipocytes by an insulin-receptor mediated process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 84:459-463.
- Smith, R.M., N.H. Laudenslager, N. Shah, and L. Jarett. 1987. Insulin binding and processing by H4IIEC3 hepatoma cells: ultrastructural and biochemical evidence for a unique route of internalization and processing. *J Cell Physiol.* 130:428-435.
- Sotillo, R., E. Hernando, E. Diaz-Rodriguez, J. Teruya-Feldstein, C. Cordon-Cardo, S.W. Lowe, and R. Benezra. 2007. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell.* 11:9-23.
- Sprenger, E., and S. Witte. 1980. The diagnostic significance of flow cytometric nuclear DNA measurement in gastroscopic diagnosis of the stomach. *Pathol Res Pract.* 169:269-275.
- Stewart, S., and G. Fang. 2005. Anaphase-promoting complex/cyclosome controls the stability of TPX2 during mitotic exit. *Mol Cell Biol.* 25:10516-10527.
- Stokes WS. 2000a. Humane Endpoints for Laboratory Animals Used in Toxicity Testing. In: Balls M, van Zeller AM, Halder M, eds. *Progress in the Reduction, Refinement, and Replacement of Animal Experimentation.* Amsterdam: Elsevier. p 897-906.
- Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel, and M.P. Rout. 2010. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:490-501.

- Tanenbaum, M.E., L. Macurek, A. Janssen, E.F. Geers, M. Alvarez-Fernandez, and R.H. Medema. 2009. Kif15 cooperates with eg5 to promote bipolar spindle assembly. *Curr Biol.* 19:1703-1711.
- Tatsuka, M., S. Sato, S. Kitajima, S. Suto, H. Kawai, M. Miyauchi, I. Ogawa, M. Maeda, T. Ota, and T. Takata. 2005. Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic.
- Taverna, R.D., Langdon, R.G. 1973. Reversible association of cytochalasin B with the human erythrocyte membrane. Inhibition of glucose transport and the stoichiometry of cytochalasin binding. *Biochim Biophys Acta*, 323, 207-19
- Telzer, B.R., M.J. Moses, and J.L. Rosenbaum. 1975. Assembly of microtubules onto kinetochores of isolated mitotic chromosomes of HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:4023-4027.
- Tibes, R., S.M. Kornblau, Y. Qiu, S.M. Mousses, C. Robbins, T. Moses, and J.D. Carpten. 2008. PI3K/AKT pathway activation in acute myeloid leukaemias is not associated with AKT1 pleckstrin homology domain mutation. *British journal of haematology.* 140:344-347.
- Tonon, G., K.K. Wong, G. Maulik, C. Brennan, B. Feng, Y. Zhang, D.B. Khatri, A. Protopopov, M.J. You, A.J. Aguirre, E.S. Martin, Z. Yang, H. Ji, L. Chin, and R.A. Depinho. 2005. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9625-9630.
- Trieselmann, N., S. Armstrong, J. Rauw, and A. Wilde. 2003. Ran modulates spindle assembly by regulating a subset of TPX2 and Kid activities including Aurora A activation. *J Cell Sci.* 116:4791-4798.
- Tsai, M.Y., C. Wiese, K. Cao, O. Martin, P. Donovan, J. Ruderman, C. Prigent, and Y. Zheng. 2003. A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol.* 5:242-248.
- Van de Weerd, B. C. & Medema, R. H. 2006. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 5, 853–864
- Vanneste, D., M. Takagi, N. Imamoto, and I. Vernos. 2009. The role of Hklp2 in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. *Curr Biol.* 19:1712-1717.
- Vos JW, Pieuchot L, Evrard JL, Janski N, Bergdoll M, de Ronde D, Perez LH, Sardon T, Vernos I, Schmit AC. 2008. The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *Plant Cell.* **20(10):2783-97. Epub 2008 Oct 21.**
- Wade, R.H. 2009. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol.* 43:177-191.

- Wang, W., A. Budhu, M. Forgues, and X.W. Wang. 2005. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol.* 7:823-830.
- Wilde, A., S.B. Lizarraga, L. Zhang, C. Wiese, N.R. Gliksman, C.E. Walczak, and Y. Zheng. 2001. Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat. Cell Biol.* 3:221–227
- Witt, P.L., H. Ris, and G.G. Borisy. 1980. Origin of kinetochore microtubules in Chinese hamster ovary cells. *Chromosoma.* 81:483-505.
- Wittmann, T., A. Hyman, and A. Desai. 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol.* 3:E28-34.
- Wittmann, T., H. Boleti, C. Antony, E. Karsenti, and I. Vernos. 1998. Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J Cell Biol.* 143:673-685.
- Wittmann, T., M. Wilm, E. Karsenti, and I. Vernos. 2000. TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol.* 149:1405-1418.
- Wu, A., L. Sciacca, and R. Baserga. 2003. Nuclear translocation of insulin receptor substrate-1 by the insulin receptor in mouse embryo fibroblasts. *Journal of cellular physiology.* 195:453-460.
- Yuan, T.L., and L.C. Cantley. 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene.* 27:5497-5510.
- Zhang, D., T. Hirota, T. Marumoto, M. Shimizu, N. Kunitoku, T. Sasayama, Y. Arima, L. Feng, M. Suzuki, M. Takeya, and H. Saya. 2004. Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene.* 23:8720-8730.
- Zhang, L., H. Huang, L. Deng, M. Chu, L. Xu, J. Fu, Y. Zhu, X. Zhang, S. Liu, Z. Zhou, and Y. Wang. 2008. TPX2 in malignantly transformed human bronchial epithelial cells by anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide. *Toxicology.* 252:49-55.
- Zheng, Y., M.L. Wong, B. Alberts, and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature.* 378:578-583.